

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares



**Infección por VIH-2 en España: Aspectos  
epidemiológicos y respuesta al  
tratamiento con inhibidores de la  
integrasa**

Silvia Requena Galindo

Madrid, 2019

## **AGRADECIMIENTOS**

---

Hay una frase que me gusta mucho y dice así: “El éxito de la vida consiste siempre, en seguir adelante”. Para mí, refleja la necesidad de confiar, aceptar y aprovechar las distintas circunstancias de la vida, poniendo además el empeño necesario para lograr los objetivos que nos propongamos. Afortunadamente, nunca estamos solos en la consecución de nuestros objetivos, lo que hace que el camino hacia ellos sea más ameno. A mi lado, he tenido a personas muy cercanas que me han apoyado y ayudado a mantener la perspectiva en todo momento. Además, durante estos últimos cuatro años, he tenido la suerte de conocer a otras personas que también me han ayudado y brindado grandes oportunidades de crecer laboral y personalmente. A todas ellas, quiero darles las gracias por haberme acompañado, de alguna manera, en la realización de este trabajo.

Al Dr. Valentín Cuervas-Mons, por su amabilidad y profesionalidad. Gracias por haberme dado un voto de confianza sin conocerme, al ponerme en contacto con Carmen y darme la posibilidad de desarrollar mi doctorado en el laboratorio de medicina interna.

A la Dra. Carmen de Mendoza, por haber dirigido mi tesis durante estos cuatro años. Por sus enseñanzas, por la seguridad que me ha transmitido en muchos momentos, por su fortaleza y lucha constante, por confiar en mí durante el desarrollo de esta tesis y por contar conmigo.

A Laura Benítez y Ana Treviño por estar ahí durante mi aterrizaje en el hospital. A Ana por enseñarme a dar los primeros pasos en el laboratorio y a Laura por darme consejos y estar disponible para hablar cuando lo he necesitado.

A todos mis compañeras y compañeros, Raquel, María Jesús, Silvia, Gloria, Concha, Cati, al Dr. Vargas, Isabella, Miriam, Itzíar, Pablo, Artur y el Dr. Miguel Yebra. ¡Por todos los buenos momentos que compartí con ellos y tantas cosas que aprendí! Por la inspiración que transmitís, el espíritu de superación que tenéis y por vuestra ayuda cuando lo necesité.

Gracias a todos los médicos y residentes de Servicio de Medicina Interna, de los que he podido aprender en las reuniones semanales.

A Elvira, por ser tan cercana y por haberme resuelto dudas del mundo de la secuenciación. Y a Sandra, por sus consejos.

A Aurora, por su disponibilidad y atención durante estos 4 años.

A Andrea, Nacho y Paloma, porque a pesar de no compartir con ellos el día a día en el laboratorio, me aconsejaron y ofrecieron su ayuda. ¡Gracias!

A todos los miembros del grupo español de estudio del VIH-2 y HTLVII y a vuestra participación en las reuniones anuales, en las que he aprendido de vuestra profesionalidad y conocimiento. Gracias por vuestra colaboración en el desarrollo de esta tesis. Quiero hacer un agradecimiento especial a Estrella Caballero, Rafael Benito y Ana Belén Lozano, por su amabilidad al responderme a tantísimos correos.

A todas las experiencias vividas gracias al doctorado: ¡¡asistencia a congresos y cursos!! Con todos los viajeitos que ello implica. A Carmen, de Málaga, por toda su ayuda con el tema de la filogenia.

A mis “Sacha Meisin”, Diana y Bea, por compartir conmigo muchos años de ilusión desde que se cruzaron nuestros caminos en la carrera. Porque, aunque hayan pasado muchos años desde nuestros famosos desayunos en el civis, seguís aquí y por mucho tiempo que pase espero que siga siendo así.

A Yoli, Elisa, Ana, Alba y Hada. Por haber crecido y madurado conmigo y por apoyarme, confiar en mí y darme ánimo.

A Carlos, por su apoyo, cariño y por hacerme desconectar. Por compartir tantos buenos momentos y darme abrazos infinitos.

A mis padres, a mi hermana y a Kiko. Por todo el cariño y apoyo que me habéis dado siempre. Gracias por confiar en mí, por escucharme y aconsejarme siempre que lo he necesitado y, sobre todo, por entenderme en los momentos de más estrés. Gracias también a mis abuelos, porque han estado siempre pendientes de preguntarme cómo iba y de animarme.

## RESUMEN

---

En 1985 se identificó un patrón atípico de reactividad serológica frente al VIH-1 en prostitutas senegalesas. De forma inequívoca los sueros reconocían antígenos del SIV. Un año más tarde, Clavel y colaboradores aislaron un nuevo virus de inmunodeficiencia humana, denominado VIH-2, en africanos occidentales. En Europa, la mayoría de las personas VIH-2+ son originarias de África occidental. En España, la llegada de africanos con infección por VIH-2, llevó a la creación del grupo español de estudio de la infección por VIH-2 en 1989. Hasta diciembre de 2018, se han comunicado 373 casos en nuestro país y aproximadamente el 10% presenta coinfección por VIH-1. La infección por VIH-2 presenta peculiaridades diagnósticas, epidemiológicas y terapéuticas que deben ser consideradas para un correcto manejo de las personas con esta infección. En esta tesis hemos abordado aspectos epidemiológicos y terapéuticos de la infección por VIH-2 en España.

Para empezar, analizamos la prevalencia de las personas con coinfección VIH-1+VIH-2, así como su seguimiento clínico y terapéutico. En total se identificaron 34 sujetos, un 9% de las personas VIH-2+. Se describió una mayoría de subtipos CRF02\_AG y B para el VIH-1 y de A para el VIH-2. Tras 34 meses en tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) basado en inhibidores de proteasa o inhibidores de la integrasa (INI), el porcentaje de pacientes con supresión virológica para VIH-1, VIH-2 y VIH-1+VIH-2 fue del 87%, 80% y 70%, respectivamente. También se describió un aumento de +212 linfocitos T-CD4+/ $\mu$ L.

El segundo objetivo que se persiguió en esta tesis fue la evaluación de la eficacia del TARGA que incluía INI en pacientes VIH-2+ naïve (18 sujetos) y pretratados (26 sujetos). Después de una mediana de 13 meses en tratamiento, el porcentaje de pacientes con carga viral indetectable y aumento de linfocitos T CD4+ fue del 89% y +82 células/ $\mu$ L y del 65,4% y +126 células/ $\mu$ L, respectivamente. En 12/15 sujetos con fracaso virológico (FV) se detectaron mutaciones asociadas a resistencia en la integrasa: 2 en naïve y 10 en pretratados. Estas fueron: N155H (5), Q18H/R (3), Y143C/G (3) y por primera vez en el VIH-2, se identificó el cambio R263K (1).

Por último, se analizaron secuencias de la región de la integrasa del VIH-2 en 20 sujetos naïve para los INI y en 10 individuos con FV a raltegravir (RAL). En las secuencias de sujetos naïve, solo se identificó el cambio S138A en un paciente, mientras que los patrones de resistencia identificados en 9 pacientes con FV a RAL fueron Y143C/G (3), Q148R+G140A/S (2) y N155H+A153S/G (4), los mismos que los observados en el VIH-1. Cinco de estos sujetos fueron rescatados con dolutegravir. Aunque inicialmente se observó buena respuesta en 4 de ellos, 3 hicieron un rebrote viral a los 6 meses. Tras este segundo fracaso se identificaron nuevos cambios: Q148K, Q148Q/R y G118R.

In 1985, an atypical HIV-1 serological reactivity was observed in Senegalese women who were commercial sex workers. Unequivocally, their sera recognized SIV antigens. One year later, Clavel and colleagues isolated a new human immunodeficiency virus, termed HIV-2, from West African individuals. In Europe, the majority of HIV-2+ persons come from West Africa. In Spain, the arrival of HIV-2 infected Africans led to the foundation of the “HIV-2 Spanish study group” back in 1989. Up to December 2018, 373 cases had been communicated to the national registry of HIV-2+ patients, of whom 10% were coinfecting with HIV-1. HIV-2 infection shows diagnostic, epidemiological and therapeutic peculiarities which must be addressed to properly monitor the affected patients. In this thesis, we have covered epidemiological and therapeutic aspects of HIV-2 infection in Spain.

Firstly, we analysed the proportion HIV-1+HIV-2+ coinfecting patients, as well as their clinic and therapeutic follow-up. A total of 34 were identified, which represented a 9% over HIV-2+ persons. The majority of subtypes were CRF02\_AG and B for HIV-1 and A for HIV-2. After 34 months taking combined antiretroviral treatment (cART) based on integrase strand transfer inhibitors (INSTI) or protease inhibitor, the percentage of patients with undetectable HIV-1, HIV-2 or HIV-1+HIV-2 plasmatic RNA levels were 87%, 80% and 70%, respectively. An increment of +212 CD4+ T lymphocytes/ $\mu$ L was evidenced.

The second objective pursued in this thesis was to assess the efficacy of an INSTI-based cART in HIV-2+ naïve patients (18 individuals) and treatment-experienced persons (26 individuals). After a median of 13 months on treatment, the percentage of patients with undetectable viral load (VL) and the increment in the CD4+T-cell count were 89% and +82 cells/ $\mu$ L and 65.4% and +126 cells/ $\mu$ L, respectively. In 12/15 individuals with virological failure (VF), resistance associated substitutions in the integrase gene were detected. Of those, 2 occurred in naïve and 10 in treatment-experienced patients and were: N155H (5), Q18H/R (3), Y143C/G (3) and, for the first time in HIV-2, R263K (1).

Finally, HIV-2 integrase sequences from 20 INSTI-naïve individuals and 10 raltegravir (RAL) experienced patients with VF were analysed. Only one patient in the naïve group harboured the secondary mutation S138A, whereas the resistance pathways selected in 9 patients with RAL VF were Y143C/G (3), Q148R+G140A/S (2) and N155H+A153S/G (4), the same which were identified in HIV-1 at RAL-VF. Five of these patients were rescued with DTG. Although 4 of them initially depicted a substantial decrease in the VL, 3 rebounded 6 months later. After this second VF to INSTI, three new substitutions were identified: Q148K, Q148Q/R and G118R.

## ÍNDICE

---



<b><u>ABREVIATURAS</u></b> .....	1
<b><u>1. INTRODUCCIÓN</u></b> .....	7
1.1. Estructura y genoma del VIH-2.....	7
1.2. Historia natural de la infección por VIH-2.....	8
1.3. Epidemiología de la infección por VIH-2 a nivel mundial.....	9
1.4. Epidemiología de la infección por VIH-2 en España.....	10
1.5. Diagnóstico de infección por VIH-2 y de coinfección por VIH-1+VIH-2.....	11
1.6. Epidemiología y biología de la coinfección por VIH-1+VIH-2.....	13
1.7. Tratamiento en la infección por VIH-2.....	14
1.8. Inhibidores de última generación en el tratamiento de la infección por VIH-2: los inhibidores de la integrasa (INI).....	19
1.9. Resistencia a los inhibidores de la integrasa (INI).....	23
1.9.1. Variabilidad genética natural en el gen de la integrasa del VIH-2.....	25
1.9.2. Susceptibilidad del VIH-2 a los inhibidores de la integrasa (INI) y experiencia en la práctica clínica.....	25
<b><u>2. OBJETIVOS</u></b> .....	27
<b><u>3. PACIENTES Y MÉTODOS</u></b> .....	31
3.1. Grupo español de estudio de la infección por VIH-2.....	33
3.2. Procesamiento de las muestras y almacenamiento.....	36
3.3. Cuantificación de la carga viral (CV) de VIH-2.....	36
3.3.1. Curva de calibración y controles positivos.....	37
3.3.2. Condiciones de amplificación.....	39
3.4. Análisis de resistencias al tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) en la infección por VIH-2.....	41
3.5. Detección, purificación y secuenciación del amplicón.....	42
3.6. Análisis de las secuencias e interpretación de los datos.....	43

<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
4.1. Respuesta al tratamiento de los pacientes coinfectados por VIH-1 y VIH-2 que residen en España.....	47
4.1.1. Diagnóstico de la coinfección por VIH+1 y VIH-2 en España.....	47
4.1.2. Características epidemiológicas de los pacientes con coinfección por VIH-1 y VIH-2....	49
4.1.3. Respuesta al tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) de los pacientes coinfectados.....	51
4.2. Experiencia clínica con los inhibidores de la integrasa (INI) en sujetos infectados por VIH-2 que residen en España.....	52
4.2.1. Selección de pacientes, técnicas empleadas y criterios metodológicos.....	52
4.2.2. Características principales de la población de estudio.....	53
4.2.3. Respuesta al tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) basado en inhibidores de la integrasa (INI) en pacientes naïve.....	54
4.2.4. Respuesta al tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) basado en inhibidores de la integrasa (INI) en pacientes pretratados.....	54
4.2.5. Fracasos virológicos (FV) y mutaciones de resistencia a los inhibidores de la integrasa (INI).....	55
4.3. Mutaciones de resistencia a raltegravir y su impacto en la respuesta a dolutegravir en pacientes infectados por VIH-2 .....	58
4.3.1. Selección de pacientes y técnicas empleadas.....	58
4.3.2. Características epidemiológicas y análisis del gen de la integrasa en pacientes naïve para los inhibidores de la integrasa (INI) y en pacientes tratados con raltegravir en fracaso virológico (FV).....	59
4.3.3. Evolución del gen de la integrasa tras fracaso virológico (FV) a raltegravir.....	62
4.3.4. Respuesta al tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) basado en dolutegravir en pacientes cuyos virus habían seleccionado previamente mutaciones asociadas a resistencia a raltegravir.....	62
4.3.5. Evolución del gen de la integrasa tras fracaso virológico (FV) a dolutegravir.....	63

<b>5. <u>DISCUSIÓN</u></b>	65
5.1. Respuesta al tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) de los pacientes coinfectados por VIH-1 y VIH-2 que residen en España	67
5.2. Experiencia clínica con los inhibidores de la integrasa (INI) en sujetos infectados por VIH-2 que residen en España	69
5.3. Mutaciones de resistencia a raltegravir y su impacto en la respuesta a dolutegravir en pacientes infectados por VIH-2	74
<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	77
<b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b>	81
<b><u>ANEXOS</u></b>	93
Anexo I. Índice de tablas y figuras	95
Anexo II. Miembros del grupo español de estudio de la infección por VIH-2	96
Anexo III. Publicaciones durante el periodo de tesis doctoral	97
1. Publicaciones surgidas de esta tesis	97
2. Comunicaciones a congresos	98
3. Otras publicaciones durante el periodo de tesis doctoral	99
Anexo IV. Copia de las publicaciones surgidas de esta tesis	100

## ABREVIATURAS

---

**3TC:** Lamivudina  
**AA:** Aminoácido  
**ABC:** Abacavir  
**ADN:** Ácido desoxirribonucleico  
**APV:** Amprenavir  
**ARN:** Ácido ribonucleico  
**ATV:** Atazanavir  
**AZT:** Zidovudina  
**BIC:** Bictegravir  
**CAB:** Cabotegravir  
**CCR5:** Receptor tipo 5 de quimiocina C-C  
**CMSP:** Células Mononucleares de Sangre Periférica  
**CT:** ciclo de amplificación en el que se supera el umbral establecido  
**CV:** Carga viral. Niveles de ARN plasmático del virus, expresado como log de nº de copias/mL  
**CXCR4:** Receptor 4 de quimiocina C-X-C  
**DRV/c:** Darunavir potenciado con cobicistat  
**DRV/r:** Darunavir potenciado con ritonavir  
**DTG:** Dolutegravir  
**EDTA:** Ethylenediamine tetraacetic acid  
**EVG:** Elvitegravir  
**FPV:** Fosamprenavir  
**FTC:** Emtricitabina  
**FV:** Fracaso virológico  
**IC<sub>50</sub>:** Concentración de fármaco necesaria para suprimir el 50% de la replicación viral  
**IP:** Inhibidor de proteasa  
**IDV:** Indinavir  
**IN:** integrasa de VIH-2  
**INI:** Inhibidor de integrasa  
**ITIAN:** Inhibidores de la Transcriptasa Inversa Análogos de Nucleós(t)idos  
**ITINAN:** Inhibidores de la Transcriptasa Inversa No Análogos de Nucleós(t)idos  
**Kb:** Kilobases  
**LPV:** Lopinavir  
**LTR:** Secuencias terminales largas repetidas

**MVC:** Maraviroc

**Nt.:** Nucleótido

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PIC:** Complejo de preintegración

**PR:** proteasa de VIH-2

**RAL:** Raltegravir

**RIC:** Rango intercuartílico

**RT:** retrotranscriptasa de VIH-2

**RT-PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa

**RT-qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real y en transcripción reversa

**RTV:** Ritonavir

**SIDA:** Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

**SIV:** Virus de la inmunodeficiencia de los simios (en inglés simian immunodeficiency virus)

**SQV:** Saquinavir

**TPV:** Tipranavir

**T-20:** Enfuvirtida

**TAF:** Tenofovir alafenamida

**TARGA:** Tratamiento antirretroviral de gran actividad

**TDF:** Tenofovir disoproxil fumarato

**VIH:** Virus de la Inmunodeficiencia Humana

**VHC:** Virus de la hepatitis C

**VHB:** Virus de la hepatitis B

**$\Delta Rn$ :** diferencia de  $Rn$  ( $Rn$  es la fluorescencia del colorante indicador dividida entre la de uno de referencia pasiva).

# INTRODUCCIÓN

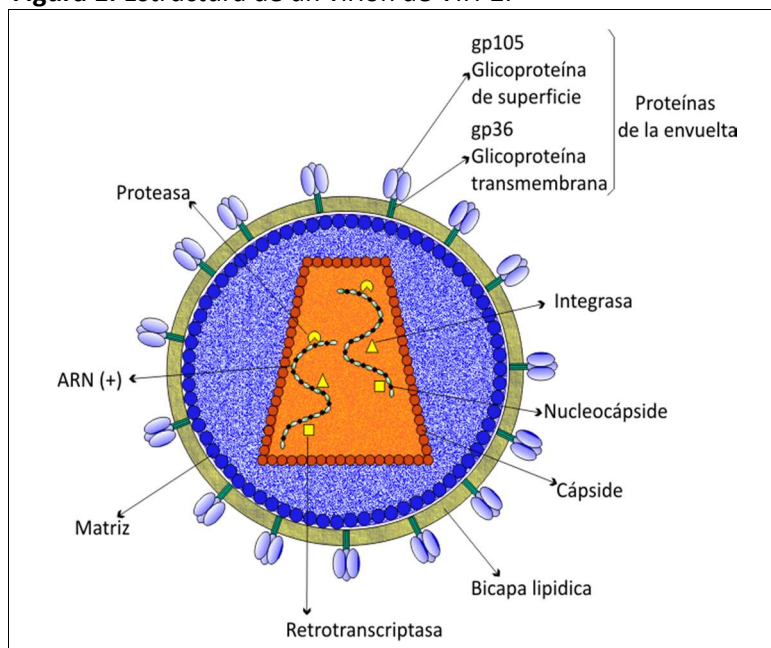
---

El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2 fue aislado por primera vez en Cabo Verde y en Guinea Bissau en el año 1986. Los sujetos portadores padecían enfermedades definitorias de SIDA pero las pruebas serológicas mostraban unos patrones indeterminados para la infección por VIH-1 (Clavel et al., 1986). Al igual que este, el VIH tipo 2 es un retrovirus perteneciente al género lentivirus, cuya célula diana es el linfocito T CD4+ de los humanos y puede conducir al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en los estados más avanzados de la infección. Las vías de transmisión son la sexual, la vertical, y la parenteral (por prácticas invasivas con material infectado).

### 1.1. Estructura y genoma del VIH-2

El VIH-2 es un virus envuelto con un diámetro aproximado de 100 nm. y una cápside central donde se encuentran alojadas dos moléculas de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva y las enzimas necesarias para el ciclo viral: retrotranscriptasa (RT), proteasa (PR) e integrasa (IN) (Figura 1). Las moléculas de ARN están constituidas por 10.279 nucleótidos (10,3 Kb).

**Figura 1.** Estructura de un virión de VIH-2.

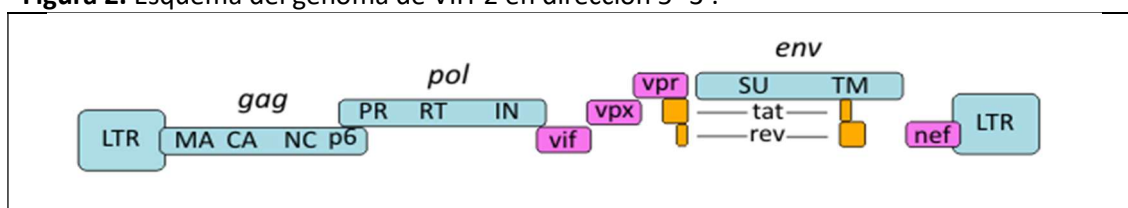


Genéticamente, el VIH-2 comparte menos del 50% de homología con el VIH-1, aunque estructuralmente, se organiza igual que el genoma de este. En ambos extremos, el VIH-2 alberga secuencias de nucleótidos repetidas no codificantes (denominadas LTR por sus siglas en inglés de "long terminal repeats"), cuya función es regular la replicación viral. Además, alberga los genes estructurales y enzimáticos *gag*, *pol* y *env* y los reguladores *tat* y *rev*. Dos de los genes



accesorios, sin embargo, difieren entre ambos tipos de VIH. Mientras que ambos comparten *vif*, *vpr*, y *nef*, el VIH-2 alberga *vpx* y el VIH-1 *vpu* (**Figura 2**) (Menéndez-Arias and Álvarez, 2014). Hipotéticamente, el gen *vpx*, posibilitaría la infección de células dendríticas y macrófagos, lo que conducirá a una respuesta inmunológica adquirida específica frente al VIH-2 de forma más temprana que lo ocurrido en el VIH-1. En general, la infección por VIH-2 cursa con un descenso más lento en la pérdida de los linfocitos T-CD4+, posiblemente debido a una menor inmunoadactivación, mayor eficacia de la respuesta inmunológica y a tasas de replicación más bajas en los linfocitos T CD4+ activos y en reposo (K. K. Vidya Vijayan et al., 2017).

**Figura 2.** Esquema del genoma de VIH-2 en dirección 5'-3'.



MA: matriz, CA: cápside, NC: nucleocápside, PR: proteasa, RT: retrotranscriptasa, IN: integrasa, SU: glicoproteína de superficie de la envuelta, TM: glicoproteína de transmembrana de la envuelta LTR: secuencias terminales largas repetidas.

## 1.2. Historia natural de la infección por VIH-2

En la infección por este retrovirus, al igual que en el VIH-1, existe una correlación inversa entre la carga viral (CV) plasmática y el número de células CD4+ (Andersson et al., 2000). Sin embargo, a diferencia de este, el VIH-2 se caracteriza por conducir, en muchos individuos, a una pérdida más lenta de los linfocitos T CD4+, posiblemente como consecuencia de CV más bajas en plasma (Gottlieb et al., 2002). Por otro lado, estos menores niveles de ARN plasmático también han sido observados en fluidos genitales y orales (Gottlieb et al., 2018). Sin embargo, algunos sujetos avirémicos, también mostraron un descenso en los linfocitos T CD4+ (Thiébaud et al., 2011) a lo largo del tiempo en ausencia de tratamiento antirretroviral y hay estudios que muestran niveles de ARN plasmático y tasa de mortalidad comparables con la infección por VIH-1, cuando el recuento de linfocitos CD4+ es bajo (Berry, 1998; van der Loeff et al., 2002). Teniendo en cuenta que los niveles ADN proviral son similares a los del VIH-1, posteriormente se demostró que el VIH-2 exhibía menores tasas de replicación (MacNeil et al., 2007). De hecho, hasta un 25% de los pacientes podría tener niveles de viremia inferiores a 40 copias/mL (Gottlieb et al., 2002). Estas características podrían explicar la mayor duración de la infección crónica asintomática, así como la menor tasa de mortalidad y transmisión heterosexual y vertical asociadas a esta infección en comparación con el VIH-1 (Gottlieb et al., 2018).

### 1.3. Epidemiología de la infección por VIH-2 a nivel mundial

El origen del VIH-2, al igual que del VIH -1, es zoonótico. Estudios de filogenia molecular señalaron al virus de la inmunodeficiencia de los simios (SIV) como el ancestro más reciente del VIH-2, que infectaba de forma asintomática a los sooty mangabeys (*Cercocebus atys atys*) del Bosque Taï, en Costa de Marfil ([Santiago et al., 2005](#)). El salto interespecie pudo haberse producido alrededor del año 1938 (para subtipos A) ([Faria et al., 2012](#)), como consecuencia de la alimentación de cazadores con la carne de estos monos infectados, o bien por mordeduras ([Hahn et al., 2000](#)). Inicialmente, la infección por este retrovirus permaneció confinada en países del occidente de África, principalmente en áreas de Costa de Marfil y Guinea Bissau. Se cree que el bajo porcentaje de circuncisión que se practicaban en esas zonas pudo impactar significativamente en la endemidad de estos países ([Sousa et al., 2016](#)). Más tarde, durante la guerra de la independencia de Guinea Bissau (1963-1974) se produciría un brote epidémico ([Lemey et al., 2003](#)), que pudo favorecer la diseminación a otros países del occidente de África y a antiguas colonias portuguesas (Brasil, la India, Mozambique, Angola y Cabo Verde) ([Campbell-Yesufu and Gandhi, 2011](#)). En Gambia, Nigeria, Senegal, Sierra Leona, Mali y Mauritania se reportaron prevalencias superiores al 1% entre 1980 y 1990 ([O'Brien et al., 1992](#)).

Desde años atrás, la prevalencia de infección por VIH-2 en los países del occidente africano ha descendido ([van der Loeff et al., 2006](#)). Guinea Bissau fue el país con mayores tasas de infección, con prevalencias de hasta el 20% en su población con más de 40 años ([Poulsen et al., 1989](#)). Estudios posteriores han descrito una caída paulatina desde 1987 hasta 2016, cuando se describió una prevalencia global del 2,8% ([Olesen et al., 2018](#)). Mundialmente, pese a la ausencia de un sistema de vigilancia epidemiológica de esta infección a nivel global, se estiman entre 1-2 millones de personas infectadas ([Gottlieb et al., 2008](#)).

En Europa, el continuo flujo de inmigración africana supuso unos índices de aparición de esta infección significativos, principalmente en países que mantienen vínculos con los países del occidente de África. Entre estos, Portugal es el país europeo con mayor número de diagnósticos de infección por VIH-2. Hasta el año 2008 se habían descrito 1813 infecciones por este virus y durante ese año, del total de casos de SIDA, un 2,3% se diagnosticó en pacientes VIH-2+. Además, de 442 pacientes analizados, el 48% eran nativos portugueses ([Carvalho et al., 2012](#)). En Francia, entre los años 2003 y 2006 se diagnosticaron 186 casos, lo que supuso un 1.8% del total de diagnósticos de VIH ([Barin et al., 2007](#)). Fuera de Europa y África, la presencia del VIH-2 en multitud de países ha quedado reflejada en un trabajo reciente ([Gottlieb et al., 2018](#)) y se puede observar en la **Figura 3**. En Estados Unidos, pese a la alta inmigración de personas

procedentes del occidente de África, sólo se habían diagnosticado 166 personas VIH-2+ hasta el año 2010, lo que quizá refleje un gran porcentaje de casos no diagnosticados ([Saraiya et al., 2018](#)).

**Figura 3.** Mapa mundial que representa los países donde se ha documentado la presencia de personas portadoras del VIH-2.

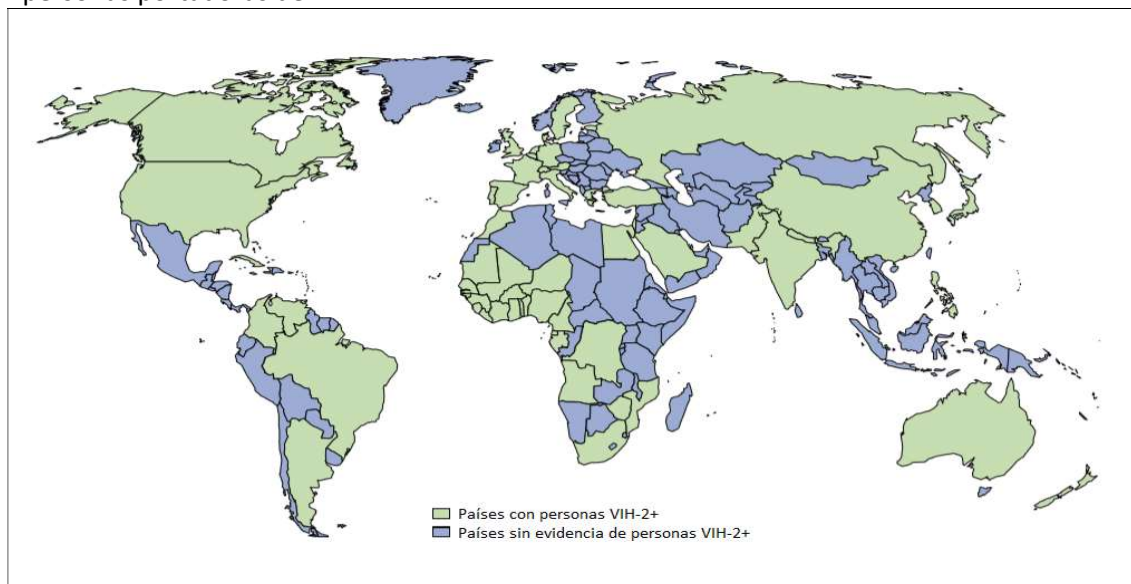


Imagen traducida al español a partir de la original. (Gottlieb et al. The Lancet HIV 2018).

Desde un punto de vista molecular, se han descrito hasta 9 subtipos distintos de VIH-2 (A-I), representantes de 9 saltos interespecie independientes del SIVsmm. Tan solo los subtipos A y B representan infecciones activas. El subtipo predominante en el occidente de África es el A, mientras que hay una minoría de subtipos B, principalmente identificados en Ghana, Burkina Faso y Mali ([Visseaux et al., 2016](#)). Además, al contrario de lo observado en el VIH-1, sólo se han documentado dos recombinantes, ambos entre los subtipos A y B (B para *gag* y *pol* y A para *env*). La primera, denominada 7312A, fue identificada en 1994 en un paciente de Costa de Marfil ([GAO et al., 1994](#)). En Japón, la identificación de esa misma variante, en otros 3 individuos no relacionados ([Ibe et al., 2010](#)), llevó a la declaración de forma circular recombinante (CRF) en 2010, designada como CRF01\_AB. El otro recombinante, referido como CM-03-510-03, fue aislado de una mujer en Camerún ([Yamaguchi et al., 2008](#)).

#### 1.4. Epidemiología de la infección por VIH-2 en España

En el caso de España, su ubicación, próxima al continente africano, ha facilitado la llegada de pateras ilegales con inmigrantes originarios de países del norte y occidente de África desde hace varias décadas. Alrededor de 1988, se describieron en Barcelona, por primera vez, sujetos extranjeros con infección por VIH-2 ([Soriano et al., 1989](#)). Este hecho desencadenó la creación del grupo español de estudio de la infección por VIH-2, en 1989.

En diciembre de 2016, el número de personas que eran portadoras del VIH-2, ascendió a 338 casos, con una media anual de 15 nuevos diagnósticos desde el año 2010. En su mayoría eran varones (63%) y procedían de países africanos (72%), conforme a la endemidad documentada en la región. Sin embargo, se observó un 16% de individuos de origen español. Las rutas de transmisión comunicadas por los pacientes fueron en su mayoría de carácter heterosexual, seguidas de las malas prácticas conducidas por los UDVP y, de forma minoritaria, por vía vertical y relaciones homosexuales (de Mendoza et al., 2017). Concretamente, esta última vía se había observado y había sido estudiada previamente en aislados de varones españoles residentes en el norte de España (Cilla et al., 2001). La mayoría de los subtipos eran A, identificados en 89 sujetos, mientras que había 12 personas infectadas por subtipos B (4 españoles, 5 de Guinea Ecuatorial, 1 de Burkina Faso, 1 de Senegal y 1 de Costa de Marfil).

En cuanto al país de origen de los pacientes identificados en España, el país con mayor número de pacientes es Guinea Bissau (76 casos), seguido de Senegal (56) y de Ghana (18). En España, las grandes ciudades como Madrid y Barcelona, son las que reúnen un mayor número de diagnósticos de forma acumulada, si bien Galicia y la provincia de Almería albergaban un llamativo número de casos, como consecuencia de marineros que trabajaban en el occidente de África y de la llegada de pateras al sur de la península, respectivamente.

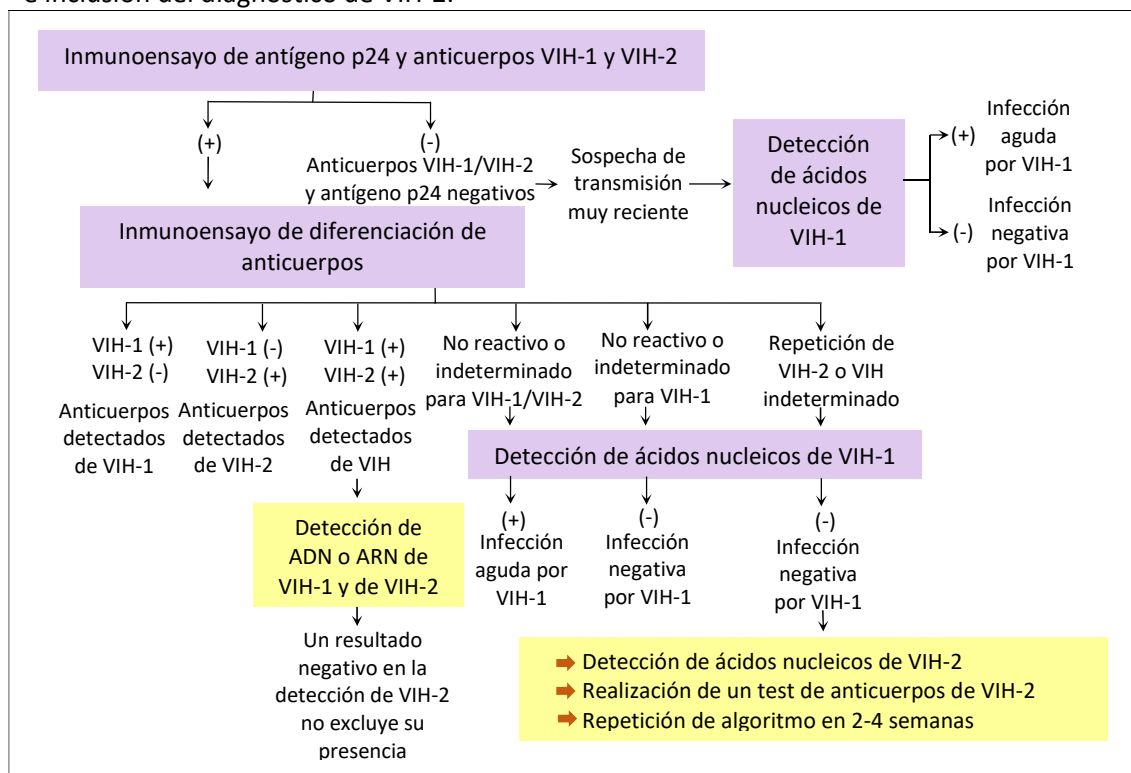
### **1.5. Diagnóstico de infección por VIH-2 y de coinfección por VIH-1+VIH-2**

Por primera vez, en 1987, dos años después de los primeros ensayos de cribados de VIH, los ELISA incorporaron antígenos del VIH-2. Sin embargo, las pruebas confirmatorias para este virus sólo eran recomendadas en caso de obtenerse un resultado negativo en la prueba confirmatoria para el VIH-1 y cuando además hubiese una sospecha de riesgo de infección por este virus minoritario. Así, la ausencia de factores de riesgo para infección por VIH-2 habría supuesto su infradiagnóstico. Más adelante, en 1997, con la llegada de los test de cribado de 4ª generación que incorporaban la detección del antígeno p24, se logró reducir a 2 semanas el periodo ventana de la infección por VIH-1, definido como el tiempo en el que no se detecta una infección reciente por VIH, debida a la ausencia de anticuerpos específicos. Además, esto implicaba la necesidad de nuevas pruebas confirmatorias que detectasen seroconversiones más recientes, lo que llevó a la introducción de los inmunoensayos de diferenciación de anticuerpos VIH-1/2 y a la detección de ácidos nucleicos de VIH-1 en pruebas confirmatorias cuyos resultados fuesen negativos o indeterminados (Alexander, 2016). La aprobación y comercialización de estos “tests” de 4ª generación comenzó en el año 2010 y pese a la existencia de ensayos de 5ª generación (desarrollados en 2015), aún siguen siendo los indicados en el algoritmo de

diagnóstico propuesto por la CDC en su última actualización de enero de 2018 ([Centers for Disease Control and Prevention and Association of Public Health Laboratories, 2014](#)).

En la **Figura 4** aparecen representados los distintos pasos a seguir en el algoritmo. Ante una reactividad indeterminada (para el VIH-1 o ambos tipos de virus) o negativa, se procederá con la detección de ácidos nucleicos del VIH-1. Sólo en los casos indeterminados para el VIH-2 y seropositivos para ambos virus, la amplificación de ambos tipos de VIH (ADN o ARN) es recomendable para la confirmación de monoinfección por VIH-2 o infección dual, respectivamente. Sin embargo, como se ha descrito anteriormente, la infección por VIH-2 cursa con niveles bajos de replicación vírica (ARN). Además, puede darse la circunstancia de la infección simultánea por ambos virus, VIH-1+VIH-2. En muestras con doble seropositividad para VIH-1 y VIH-2, la detección de ADN del VIH-2 descendió al 60.9%, hecho que subrayaría la dificultad del diagnóstico de infección concomitante por VIH-2 en pacientes portadores del VIH-1 ([Hønge et al., 2018](#)). Esta menor detección de ADN de VIH-2 proviral fue descrita anteriormente en pacientes VIH-1+ con un número bajo de linfocitos T-CD4+ ([Raugi et al., 2013a](#)). Así, el diagnóstico de infección por ambos tipos de virus es impreciso ya que ni siquiera la ausencia de ARN o ADN de VIH-2 puede excluir la presencia del virus. Por otro lado, en un test confirmatorio, un resultado con seropositividad dual podría representar únicamente una reactividad cruzada de los anticuerpos frente a un virus similar. Una forma diferente de identificar coinfecciones reales que no requiera de la amplificación de ácidos nucleicos, sería mediante la dilución seriada del suero. Así, al testar nuevamente una muestra diluida con doble reactividad, solo permanecería la reactividad específica, y la reactividad cruzada desaparecería ([Soriano et al., 1996](#)).

**Figura 4.** Algoritmo para el diagnóstico de infección por VIH basado en la propuesta por el CDC. Imagen modificada y traducida a partir del algoritmo original para su mejor comprensión e inclusión del diagnóstico de VIH-2.



En morado se encuentran los tres ensayos para el diagnóstico de la infección por VIH: inmunoensayo de 4ª generación capaz de detectar el antígeno p24 y anticuerpos frente a VIH-1 y VIH-2, inmunoensayo confirmatorio y discriminatorio VIH-1/2 y amplificación de los ácidos nucleicos del VIH-1 en muestras en las que, pese a una reactividad inicial, no se detecte reactividad o esta sea indeterminada en el inmunoensayo discriminatorio. La detección de ácidos nucleicos de VIH-1 indicaría la presencia de una infección reciente en la que aún no se han desarrollado anticuerpos específicos. En los recuadros amarillos se sugieren propuestas a seguir por los profesionales para el diagnóstico de VIH-2 ante seropositividad dual y repetición de resultados indeterminados para anticuerpos de VIH-2 sin detección de ácidos nucleicos de VIH-1.

### 1.6. Epidemiología y biología de la coinfección por VIH-1+VIH-2

La posibilidad de una coinfección por VIH-1 y VIH-2 fuera de África y en sujetos no africanos es una condición poco común. Sin embargo, su prevalencia aumenta en países con alta endemidad para el VIH-2, donde al igual que en el resto de países, el VIH-1 también está presente. En el año 1988 se confirmó la presencia concomitante de VIH-1 y VIH-2 en un individuo con seropositividad para ambos tipos de VIH (Rayfield et al., 1988). En el año 2009, un estudio refirió un 0.3-1% de coinfección en el occidente de África (Landman et al., 2009). En una revisión sobre el tema, se documentaron las mayores cifras de coinfección en mujeres prostitutas, grupo en el que se observó hasta un 38% de doble seropositividad en el año 1992, en Costa de Marfil. En Mali, Guinea Bissau, Gambia, Costa de Marfil, Senegal y Ghana, no se observaron prevalencias

superiores al 1,5%, mientras que en pacientes de Costa de Marfil con complicaciones clínicas ascendían al 17% entre los años 1987 y 1992 (de Silva et al., 2010). Sin embargo, desde la introducción del VIH-1 en Guinea Bissau, registrada en 1989, sucesivos estudios serológicos realizados en la capital del país durante 30 años, han confirmado un descenso en la prevalencia de coinfección: 1% en 1996, 0,5% en 2006 y 0,1% en 2016 (Olesen et al., 2018).

En un estudio llevado a cabo en Senegal, en mujeres dedicadas a la prostitución y seropositivas para VIH-2+, se advirtió un posible papel protector del VIH-2 frente a la adquisición del VIH-1 (Travers et al., 1995). En estudios posteriores con resultados opuestos, los autores observaron conductas de riesgo en personas VIH-2+, que conducirían a una mayor probabilidad de adquisición del VIH-1 (Aaby et al., 1997; Norrgren et al., 1999).

Desde un punto de vista biológico, los niveles plasmáticos de ARN de VIH-1 parecen ser menores en sujetos coinfectados que en monoinfectados (Andersson et al., 2000), aunque seguirían siendo mayores que los del VIH-2. Sin embargo, aunque los niveles de ADN proviral eran similares para ambos virus cuando el recuento de CD4+ era >500 células/ $\mu$ L, cuando estos descendían, la CPV del VIH-2 y el ARN plasmático disminuían, mientras que estos mismos parámetros en el VIH-1 aumentaban, reflejando un control del VIH-1 en estados avanzados (Raugi et al., 2013a). En línea con estos datos, hubo estudios en los que se asoció una tasa de mortalidad de coinfectados similar a la observada en individuos monoinfectados por VIH-1 (van der Loeff et al., 2002). Por el contrario, otros estudios documentaron una progresión más lenta a SIDA y una mayor supervivencia en personas con infección concomitante por ambos virus (Esbjörnsson et al., 2012; Esbjörnsson et al., 2014), que encajaría con la menor CV plasmática de VIH-1 y la global (VIH-1+VIH-2) en sujetos coinfectados (Andersson et al., 2000). Además, hay estudios in vitro que muestran efectos supresores del VIH-2 en la replicación viral del VIH-1 (Mahdi et al., 2018).

### 1.7. Tratamiento en la infección por VIH-2

La administración de un régimen antirretroviral óptimo, al igual que se demostró en pacientes VIH-1+, suprime de forma eficaz la replicación viral del VIH-2, con el consecuente beneficio de la mejora inmunológica y clínica de los pacientes.

El tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA), consiste en la administración de 3 fármacos distintos que inhiben varios procesos clave en la replicación del virus. Así, existen cinco familias actualmente aprobadas: inhibidores de la entrada, inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (ITINAN), inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de



nucleós/tidos (ITIAN), inhibidores de la integrasa (INI) e inhibidores de la proteasa (IP). La Figura 5 refleja el ciclo viral del VIH y las distintas dianas de actuación de estas familias de inhibidores.

**Figura 5.** Ciclo de replicación del VIH y dianas de los fármacos antirretrovirales.

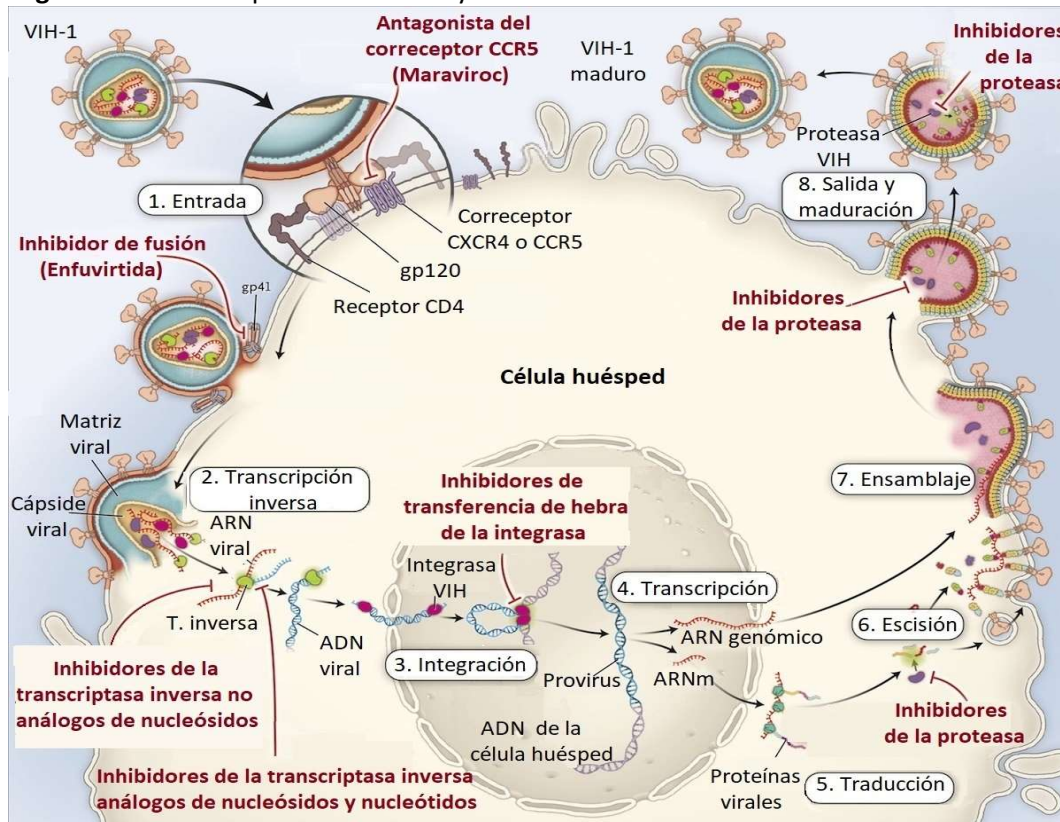


Imagen traducida al español a partir de la original. (Gandhi M et al. N Engl J Med 2014).

No existe un consenso sobre cuándo iniciar tratamiento antirretroviral en los pacientes VIH-2+. Tras su diagnóstico, un retraso en el inicio de TARGA en pacientes avirémicos y con cifras de CD4+ normales podría justificarse por el limitado número de fármacos eficaces contra el virus, ya que todos los agentes antirretrovirales aprobados han sido diseñados para el VIH-1 y presentan distinta eficacia en la inhibición de la replicación del VIH-2. Así, un paciente VIH-2+ tendrá que lidiar con un menor número de fármacos eficaces y ello podría conducir a una futura administración de terapias subóptimas. Por otro lado, hay estudios que demuestran una peor recuperación inmunológica tras el inicio del TARGA e incitarían a iniciar la toma cuando el nivel de inmunosupresión del paciente aún no esté muy comprometido ([Matheron et al., 2006](#); [Balestre et al., 2016](#)). Existen circunstancias en las que se debe iniciar el TARGA: la aparición de



sintomatología asociada a la infección avanzada por VIH-2, el estado de gestación, la coinfección por VHB, mantener relaciones sexuales con parejas serodiscordantes y la detección de cifras inferiores a 500 linfocitos CD4+/ $\mu$ L ([Gottlieb et al., 2018](#)).

El TARGA prescrito en sujetos mono infectados por VIH-2 o coinfectados por VIH-1+VIH-2 debe incluir únicamente fármacos activos frente al VIH-2, ya que ambos virus deben ser suprimidos para que se produzca una mejora inmunológica y evitar su transmisión y el desarrollo de mutaciones de resistencia. Hasta el año 2018 no había ningún ensayo clínico que evaluase la respuesta al TARGA en pacientes VIH-2+ y la administración de unos u otros fármacos se basaba en resultados de estudios in vitro, pequeñas cohortes o extrapolación de los resultados en el VIH-1 ([Gottlieb et al., 2008](#); [Gottlieb et al., 2018](#)). En general, los pacientes VIH-2+ han tenido una respuesta pobre a los regímenes prescritos ([Ekouevi et al., 2014](#)). A continuación, se tratarán los fármacos óptimos que suprimen eficazmente la replicación del VIH-2.

### **Inhibidores de entrada**

La envuelta del VIH-2 está recubierta por las glicoproteínas gp105 y gp36. El virus realiza un primer contacto con su célula diana a través de la glicoproteína de superficie gp105. Dicha proteína se unirá a la molécula CD4 de los linfocitos T-colaboradores. Esto conllevará a unos cambios conformacionales en gp105, que posibilitarán la interacción de su región-bucle V3 con los correceptores de la célula. Esta región V3 presenta especificidad por un correceptor concreto, lo que se conoce como tropismo. Pese a que hay una amplia variedad de correceptores, CCR5 y CXCR4 son los más usados por el VIH-1 y el VIH-2.

Tras la unión del correceptor con gp105, la glicoproteína de transmembrana gp36 participará en la fusión de las membranas del virus y de la célula diana. El ectodominio de gp36, posee varias regiones con funciones diferenciadas. Dentro de estas, figuran los dominios HR1 y HR2, los cuales se unen formando una horquilla.

Existen tres subclases de moléculas pertenecientes a la familia de inhibidores de entrada que han sido diseñadas para la supresión del VIH-1: las moléculas diseñadas para la inhibición de la unión de gp120 (análogo de gp105 en VIH-1) con CD4, conocidos también como inhibidores post-adhesión, los inhibidores antagonistas del correceptor CCR5 y los inhibidores de fusión de la envuelta viral con la membrana celular. En la actualidad hay un fármaco aprobado por la FDA para cada una de estas subclases. En el caso de los inhibidores post-adhesión, el primero fue

ibalizumab, aprobado en 2018. Este inhibidor mostró poca actividad en VIH-2 ([Menéndez-Arias and Álvarez, 2014](#)).

#### Inhibidores antagonistas de CCR5: Maraviroc

El mecanismo de acción de maraviroc se basa en su unión a CCR5, provocando un cambio conformacional en este que imposibilitará la unión de la región-bucle V3 en las cepas CCR5 trópicas. Por ello, este inhibidor debería usarse sólo en aquéllos pacientes que han tomado combinaciones previas y en los que se ha demostrado la presencia de virus CCR5 trópicos.

El VIH-2 presenta un tropismo más promiscuo que el VIH-1 ([Owen et al., 1998](#)). Además, no existen ensayos fiables para la determinación del tropismo en los pacientes con VIH-2. Por este motivo, maraviroc es un fármaco que únicamente se usa en aquéllos pacientes con limitadas opciones terapéuticas ([Visseaux et al., 2015](#)).

#### Inhibidores de fusión: Enfuvirtida

Enfuvirtida (T-20) fue aprobado para su uso en 2004. Se trata de un péptido sintético de 36 amino ácidos que mimetiza a un segmento de HR2 de gp41 (glicoproteína homóloga de gp36 en VIH-1). Su mecanismo de acción consiste en su unión al dominio HR1 ([Dietrich, 2001](#)), impidiendo así la unión de HR2.

En el 2004, dos estudios distintos demostraron que T-20 no era eficaz en la supresión del VIH-2 ([Poveda et al., 2004](#); [Witvrouw et al., 2004](#)). En el estudio de Witvrouw y colaboradores, se describió una baja conservación en estos 36 amino ácidos en el dominio HR2 de gp36. Este hallazgo podría explicar la ausencia de actividad del T-20 en el VIH-2.

#### **Inhibidores de la transcriptasa inversa**

La enzima RT, es un heterodímero constituido por las subunidades p51 y p66. Esta enzima lleva a cabo la retrotranscripción de una hebra de ARN en una doble cadena lineal de ADN, gracias a sus dominios polimerasa y RNasa H, en la subunidad p66. La actividad polimerasa incorporará nucleótidos de la célula huésped para la síntesis del ADN del virus, primero como cadena única y más tarde como cadena doble. Por su lado, la actividad RNasa H se encargará de eliminar la cadena de ARN que sirvió de molde durante la transcripción inversa.

### Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (ITINAN)

Los ITINAN son moléculas que inhiben la incorporación de nucleósidos al unirse a un bolsillo hidrofóbico cercano al sitio activo de la polimerasa.

Ninguno de los fármacos aprobados pertenecientes a esta familia presenta actividad de supresión del VIH-2, como se observó inicialmente para nevirapina (NVP) y efavirenz (EFV) (Witvrouw et al., 2004). Especialmente, la presencia de una isoleucina y de una leucina en las posiciones 181 y 188, respectivamente, parecen estar asociadas con esta resistencia intrínseca a los ITINAN (Menéndez-Arias and Álvarez, 2014). Además, los ITINAN de segunda generación etravirina (ETV, aprobada en 2008) y rilpivirina (RPV, 2011), tampoco mostraron una actividad supresora relevante para su uso en la práctica clínica en la infección por VIH-2, aunque sí mostraron mayor actividad que EFV y NVP (Menéndez-Arias and Álvarez, 2014).

### Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleós(t)idos (ITIAN)

El mecanismo de acción de estas moléculas se basa en su mimetismo con los nucleósidos naturales, si bien a diferencia de estos no poseen el extremo 3-OH', necesario para la elongación de la cadena creciente de ADN. Estas moléculas se administran de forma inactiva, pero su triple fosforilación en el interior celular las activa y convierte en moléculas susceptibles de ser incorporadas a la cadena creciente de ADN.

Este grupo incluye: abacavir (ABC), emtricitabina (FTC), tenofovir disoproxil fumarato (TDF) o tenofovir alafenamida (TAF), lamivudina (3TC), zidovudina (AZT) estavudina (d4T) y didanosina (ddI). Todos ellos presentan actividad frente al VIH-2, aunque la barrera genética es más baja que la observada en el VIH-1. Así, sólo serían necesarias 3 mutaciones para generar resistencia a esta clase de fármacos: K65R, Q151M y M184V (Menéndez-Arias and Álvarez, 2014).

### **Inhibidores de proteasa (IPs)**

La PR es un homodímero que se encarga de la escisión de las poliproteínas precursoras Gag, Gag-Pol y Nef, dando lugar a las proteínas de la matriz, cápside, nucleocápside, p6, PR, RT e IN. Es necesaria para que se dé la maduración del virión infectivo. Los IPs se unen a su sitio activo e impiden su actividad, deteniendo por tanto la maduración del virus y la infección de más células.

En un estudio llevado a cabo en el 2008, la susceptibilidad de aislados de VIH-2, a darunavir (DRV), saquinavir (SQV), lopinavir (LPV), atazanavir (ATV), indinavir (IDV), nelfinavir (NFV), tipranavir (TPV) y amprenavir (APV) fue evaluada (Desbois et al., 2008). Los tres primeros (DRV,

SQV y LPV) mostraron una actividad supresora similar a la observada para el VIH-1 y se consideraron, por tanto, los IPs más activos frente al VIH-2. En dicho estudio, aparecieron aminoácidos naturales que conferían resistencia al VIH-1. En el año 2016, se comprobó que cuatro mutaciones naturales presentes en el sitio de unión al sustrato de la PR del VIH-2 eran suficientes para producir resistencia a los otros IPs: I32, V47, M76 e I82 ([Raugi et al., 2016](#)).

La barrera genética de esta familia de inhibidores no es muy alta en la infección por VIH-2 ([Raugi et al., 2013b](#)). Concretamente, la adquisición de resistencia a los IPs activos (DRV, SQV y LPV) puede ocurrir con la emergencia de un solo cambio: I50V o I54M para DRV, V47A o I54M para LPV y L90M para SQV. Así, la emergencia única de I54M produciría resistencia cruzada a DRV y a LPV. Además, el triple mutante I54M +I84V+L90M generaría niveles de resistencia a estos 3 IPs.

La terapia basada en 2 ITIAN junto con un IP potenciado con ritonavir (RTV), demostró superioridad frente a los IPs no potenciados y a la terapia basada en 3 ITINAN en la infección por VIH-2 ([Balestre et al., 2016](#)). RTV es un IP que se usa a dosis bajas (100 mg) como acompañante de otro IP más activo frente a VIH-2, para aumentar los niveles de este segundo en la sangre.

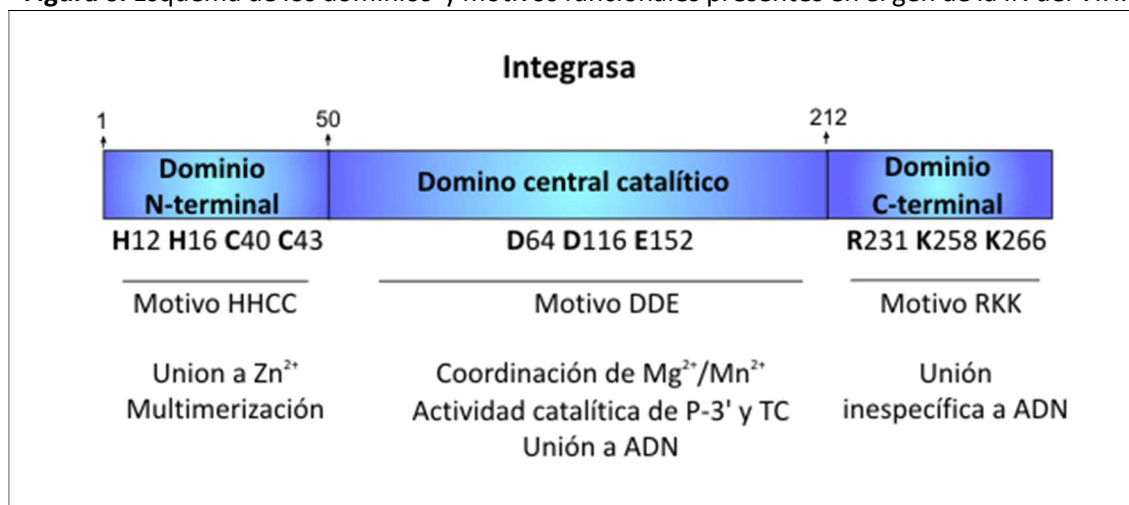
### **1.8. Inhibidores de última generación en el tratamiento de la infección por VIH-2: los inhibidores de la integrasa (INI)**

La integración de la copia de ADN (ADNc) de doble cadena viral, en el ADN cromosómico de la célula huésped es un proceso necesario para la replicación del virus, y es llevado a cabo por la enzima IN. En el VIH-2, esta tiene una longitud de 293 aminoácidos (aa) para los subtipos A, mientras que, en los subtipos B, puede variar entre 287-301 aa ([Roquebert et al., 2008b](#); [Bercoff et al., 2010](#); [Hingrat et al., 2018](#)).

La IN es una proteína de 32 kDa que incluye 3 dominios, cada uno de ellos con un motivo importante para la actividad de la proteína. En el dominio N-terminal (DNT: posiciones 1-50) se encuentra el motivo histidina en la posición 12, histidina 16, cisteína 40 y cisteína 43 (HHCC). Este motivo coordina un átomo de zinc y posibilita la multimerización de la IN. El sitio activo de esta enzima se localiza en el siguiente dominio, el catalítico (DC: codones 51-212). El sitio activo está compuesto por tres aminoácidos, referidos como “tríada catalítica”: ácido aspártico en la posición 64, otro ácido aspártico en el codón 116 y ácido glutámico en el 152 (DDE). Estos coordinan uno o dos cationes divalentes de  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  que forman un puente con el ADN y son indispensables para la integración ([Semenova et al., 2008](#)). Finalmente, el motivo arginina 231, lisina 258 y lisina 264 (RKK), se ubica en el dominio carboxilo terminal (DCT: aa 213 hasta el

final del gen) y está involucrado en la unión a ADN de forma inespecífica. En la **Figura 6** se muestra un esquema.

**Figura 6.** Esquema de los dominios y motivos funcionales presentes en el gen de la IN del VIH.



De izquierda a derecha aparecen el dominio amino (N-) terminal, hasta el amino ácido 50, el dominio central catalítico, extendido hasta la posición 212 y el dominio carboxilo terminal, que alcanza el último amino ácido de la IN.

Aminoácidos H: histidina, C: cisteína, D: ácido aspártico, E: ácido glutámico, R: arginina, K: lisina. Los número que aparecen a la derecha indican la posición del codón referido.

Tras la retrotranscripción del ARN viral, la IN del virus se unirá a los LTR ([Semenova et al., 2008](#)). La unión adicional de otros cofactores del virus y de la célula huésped, necesarios en el proceso de integración, formará el llamado complejo preintegración (PIC). Este complejo será además el que facilite la entrada del ADNc viral al núcleo, donde tendrá lugar la integración. El factor de transcripción derivado del epitelio del cristalino, asociado con el cofactor transcripcional p75 (LEDGF/p75) forman parte del PIC y se encargan de la unión de la IN a la cromatina. Las actividades de la IN en este proceso aparecen descritas a continuación y reflejadas en la **Figura 7**.

- **Actividad de procesamiento del extremo 3' del ADNc viral (P-3')**: tras la unión de la IN al ADNc viral, la enzima catalizará la escisión endonucleolítica del dinucleótido GT (desoxiguanosina y desoxitimidina) en cada extremo (LTR) 3' del ADNc viral, mediante un ataque nucleofílico del enlace fosfodiéster A-G (desoxiadenosina y desoxiguanosina). De esta forma, los grupos hidroxilo en los extremos 3' quedarán expuestos. Esta actividad es llevada a cabo en el citoplasma celular.
- **Actividad de transferencia del ADNc viral al ADN de la célula huésped (TC)**: una vez en el interior del núcleo y tras la unión de la IN al ADN celular promovida por LEDGF/p75,

esta catalizará una reacción de transesterificación entre los extremos 3' nucleofílicos del ADNc viral y el ADN de la célula huésped. Así, el genoma viral quedará unido al ADN celular de forma irreversible.

Los dinucleótidos desapareados del extremo 5' del ADNc viral, resultantes del proceso de integración, serán posteriormente eliminados y en su lugar, las enzimas de la célula huésped repararán los espacios.

**Figura 7.** Actividades de la IN del VIH. Actividad de procesamiento 3' de los LTR del ADNc viral y transferencia de cadena de ADNc al ADN de la célula huésped.

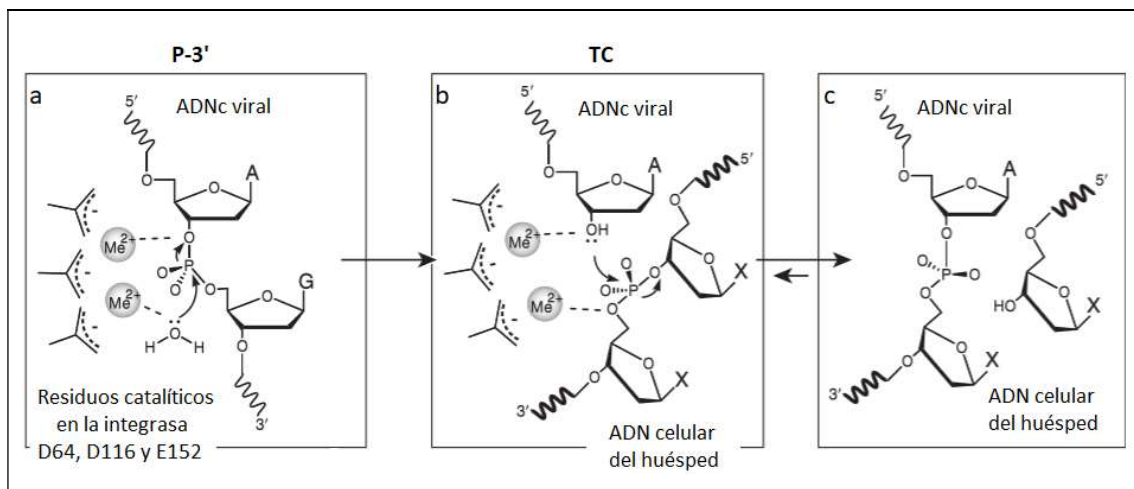
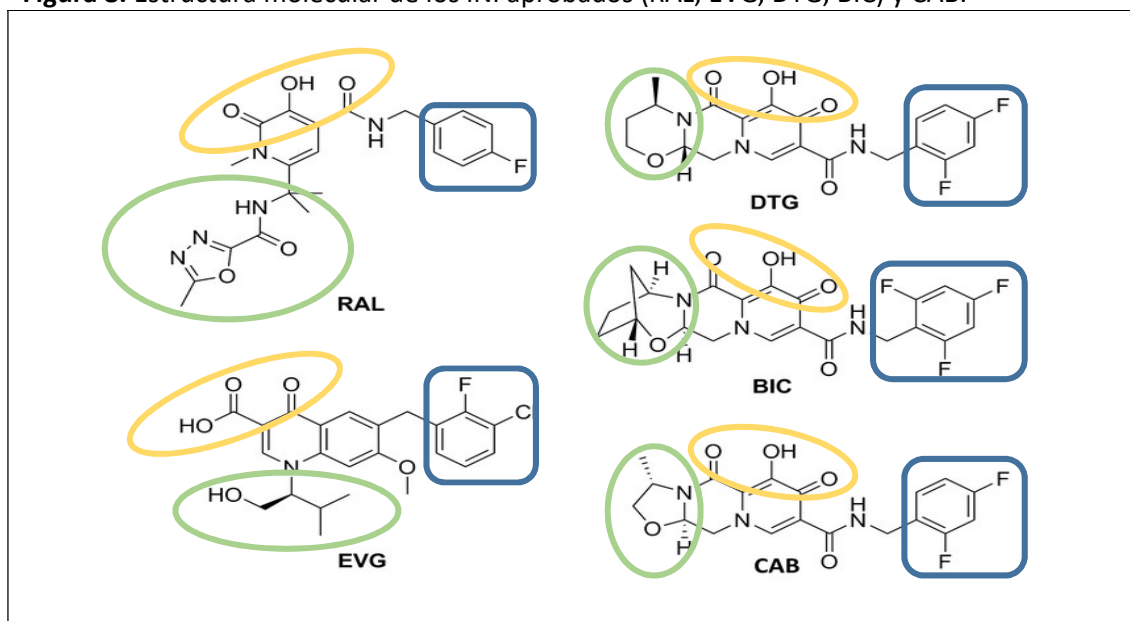


Imagen traducida al español a partir de la original. (Semenova EA et al. Adv Pharmacol 2008).

P-3': actividad de la IN del procesamiento del extremo 3'.

TC: actividad de transferencia de cadena de la IN.

Todos los INI aprobados actúan bloqueando la actividad de transferencia de las cadenas de ADN viral a los cromosomas humanos. La estructura molecular de los INI consiste en un grupo bencilo halogenado, un núcleo quelante de metales y una cadena lateral. El grupo quelante de metales secuestra los cationes de  $Mg^{2+}$  presentes en el sitio activo de la IN para evitar la interacción con el ADN de la célula huésped, mientras que el grupo bencilo actúa en un bolsillo hidrofóbico situado cerca del sitio activo y puede interactuar tanto con el ADNc viral, como con la IN, tras la formación del PIC. Así, las mutaciones asociadas a resistencia en el gen de la IN impedirán estas interacciones inhibitorias (Grobler and Hazuda, 2014). La estructura molecular de estos INI puede ser observada en la **Figura 8**.

**Figura 8.** Estructura molecular de los INI aprobados (RAL, EVG, DTG, BIC) y CAB.

Los cuadrados en azul indican el grupo bencilo halogenado, los grupos quelantes de metales aparecen redondeados en amarillo y los círculos verdes indican las cadenas laterales.

Dentro de la familia de los INI están los de primera y segunda generación. Raltegravir (RAL) y elvitegravir (EVG) pertenecen a los de la 1ª generación. RAL fue aprobado por la FDA en el 2007 para pacientes VIH-1+ con limitadas opciones terapéuticas y en el 2009 como fármaco en primera línea de tratamiento. En el año 2012, se aprobó EVG. Ambos tienen una barrera genética baja o modesta y, además, RAL debía ser administrado 2 veces al día. Por su lado, EVG fue coformulado en una pastilla única junto con TDF/TAF y FTC y estaba potenciado con cobicistat para poder ser administrado una única vez al día. Entre las mayores limitaciones de estos INI, estaba la resistencia cruzada que existe entre las variantes que emergen en ambos, de forma que sujetos que fracasaran a uno de ellos no podrían ser rescatados con el otro. Los INI de 2ª generación son dolutegravir (DTG), aprobado en 2013, bictegravir (BIC), aprobado en 2018 y cabotegravir (CAB), en fases de investigación clínica avanzada. Estos inhibidores son más potentes que RAL y EVG. Además, la barrera genética es más alta ([Thierry E et al., 2017](#)). Los tres albergan una estructura similar que incluye un conector más largo entre los grupos bencilo y los grupos quelantes de metales. Además, los INI de 2ª generación presentan mayores tiempos de disociación del complejo IN/ADN y, como ocurre en el caso de DTG, es posible que sea la mayor adaptabilidad estructural a los cambios producidos por las mutaciones a los INI de 1ª generación, lo que posibilite el mantenimiento de la actividad de DTG y BIC frente a algunas variantes asociadas a resistencia a RAL y EVG. Sin embargo, a diferencia de estos, CAB no fue diseñado para retener actividad frente a variantes resistentes sino para ser administrado de forma inyectable y a largo plazo en pacientes en riesgo de adquirir la infección por VIH, es decir, como

tratamiento preventivo o profiláctico (PrEP), o como alternativa para su uso en pacientes infectados ([Benítez-Gutiérrez et al., 2018](#)). Con esta nueva formulación se pretende asegurar la adherencia al tratamiento antirretroviral.

### 1.9. Resistencia a los inhibidores de la integrasa (INI)

La IN del VIH-1 y del VIH-2 comparten un 60% en su secuencia de aminoácidos y albergan los mismos motivos HHCC, DDE y RKK. Por ello, la caracterización de los patrones de resistencias a los INI en el VIH-1 ha servido como referencia para la búsqueda de variantes asociadas a resistencia en la IN del VIH-2. A continuación, se explicarán brevemente las vías de resistencia a los INI en el VIH-1 descritas en una revisión sobre el tema ([Anstett et al., 2017](#)) e incluidas en la base de datos de resistencias al VIH-1 de la Universidad de Standford ([Stanford HIV Drug Resistance Database](#)). Las mutaciones de resistencia a los INI aparecen en 3 vías o patrones que son excluyentes entre sí.

Las principales variantes, asociadas a resistencia a RAL y a EVG en el VIH-1, son N155H y Q148H/R/K, mientras que los cambios Y143C/R/H/K/S/G/A se asocian de forma exclusiva al uso de RAL, debido a la interacción del anillo de oxidazol con este residuo. Los cambios descritos en esta posición más frecuentes fueron cisteína y arginina. Por sí solos, los cambios en esta posición generan niveles bajos y moderados de resistencia, que aumentan significativamente en presencia de mutaciones secundarias, como T97A, L68V o L74M. Por el contrario, las sustituciones en los residuos N155 y Q148 provocan un cambio conformacional en el sitio activo de la IN que impide la unión de los INIs. Las sustituciones en la posición Q148 generan un defecto notable en la capacidad replicativa del virus, por lo que frecuentemente aparece el cambio compensatorio G140A/S. El cambio N155H no tiene un gran impacto en la replicación del virus y es rara la selección de 2 mutaciones secundarias, suficientes además para generar altos niveles de resistencia con RAL. Entre estas, destacarían E92Q y T97A+V151I. El cambio N155H parece producir una mayor pérdida de susceptibilidad a EVG. Además, existen otras dos vías de resistencia a este INI: T66A/I/K y E92Q/G. Finalmente, la mutación S147G constituye otra vía de resistencia a EVG, pero requiere de la presencia de >2 mutaciones secundarias para generar niveles moderados o altos de resistencia.

El primer INI de 2ª generación fue DTG. Gracias a su mayor tiempo de vida media de unión a la enzima y a su estructura, retiene actividad frente a las variantes asociadas a resistencia a los INI de 1ª generación, a excepción de los cambios en la posición Q148. Aunque se ha documentado la emergencia de las variantes Q148 y N155 en sujetos que habían fracasado a un régimen con INI previo, la sustitución R263K, sería la específica de DTG en aislados naïve para los INI ([Quashie](#)



et al., 2012). Sin embargo, los niveles de resistencia observados para R263K fueron bajos y serían necesarias otras mutaciones para compensar el notable daño causado por R263K en la replicación viral. Los niveles de resistencia más altos a DTG y a los otros INI de 2ª generación han sido observados con los cambios Q148 y las mutaciones secundarias E138K+G140A/S y su selección no parece una amenaza en pacientes con DTG sin experiencia previa a otros INI. Además, se ha caracterizado otra vía de resistencia a DTG: la sustitución G118R, identificada en pacientes que albergaban aislados en los que el codón 118 estaba codificado por el triplete GGA, que favorecía el cambio a arginina (Brenner et al., 2016). Posteriormente se detectó en pacientes pretratados que recibieron DTG como primer INI (Wang et al., 2018; Vavro et al., 2018). Este cambio parece conducir a niveles más altos de resistencia que los de la variante R263K. A diferencia de DTG, CAB podría exhibir un comportamiento similar a los INI de 1ª generación, al haberse observado un cambio en la posición Q148 en un paciente naïve para los INI.

La Red Española de Investigación en SIDA (RIS) ha publicado una actualización en 2019 de la Guía de resistencias a los antirretrovirales. La **Tabla 1** representa una adaptación de una de las tablas que aparece en la guía y hace referencia a la interpretación de resistencias a los INI en la infección por VIH-1. El perfil de resistencias de BIC en la práctica clínica, podría ser el mismo que para DTG.

**Tabla 1.** Interpretación de resistencias a los INI de la Red Española de Investigación en SIDA (RIS).

Fármaco	RAL	EVG	DTG	BIC*
<b>Resistencia</b>	T66K E92Q/Y F121Y Y143C/H/R Q148H/K/R N155H	T66AK E92GQV S147G Q148H/K/R N155H R263K	Q148 H/K/R+ ≥2 G140A/C/S, E138A/K/T o L74I	Q148 H/K/R+ 1 G140A/C/S, E138A/K/T o L74I R263K
<b>Resistencia intermedia</b>	H51Y T66AI E92G E138A/K G140A/C/S G163R S230R R263K G1118R F121Y	H51Y E138AK G140ACS G163R S230R G118R F121Y	Q148 H/K/R+ 1 G140A/C/S, E138A/K/T o L74I R263K	G140S+Q148R G140A/C/S+Q148H/R+ E138A/K ±T97A G140A/C+Q148R+L74M

### 1.9.1. Variabilidad genética natural en el gen de la integrasa del VIH-2

El interés por el estudio del gen de la IN de VIH-2 comenzó inmediatamente después de la aprobación de RAL en 2007. El objetivo era evaluar la frecuencia polimórfica del gen y caracterizar la presencia o ausencia de posibles polimorfismos naturales que estuviesen asociados con resistencia en el VIH-1.

Los polimorfismos naturales en VIH-2 asociados a resistencia secundaria en el VIH-1 que se observaron fueron: I72, I74, A153, I165, I201 y M203 en los subtipos A e I74, A153, I165 y M203 en los subtipos B. Sin embargo, de estos, en la actualidad, solo I74 aparece contemplado en la base de resistencias de VIH de la Universidad de Standford ([Stanford HIV Drug Resistance Database](#)) y no se asociaría con pérdida de susceptibilidad a ningún INI. También se describieron cambios no asociados a resistencia, pero que ocurrían en 13 posiciones implicadas en la adquisición de resistencia en VIH-1 (51Q/R, 72V, 97Q, 125D/E, 138T/S, 146Q, 153S, 156Q, 163N/D/G, 165L, 201V, 206A, 280S/G) ([Roquebert et al., 2008b](#); [Xu et al., 2009](#)). Además, en casos aislados, se identificaron cambios que sí estaban asociados a pérdida de susceptibilidad a RAL en VIH-1. Entre estos, destacó la presencia de Y143C en 1 subtipo A y V72I, T97A y H156N en subtipos B ([Roquebert et al., 2008b](#)). Otros estudios también identificaron otras mutaciones principales de resistencia primaria a los INI en tres pacientes naïve para los INI: en 2 casos fue R263K, ([Gottlieb et al., 2011](#)), y en 1 caso se observó N155H ([Bercoff et al., 2010](#)). Pese a estos hallazgos, en un estudio en el que se analizaron, por secuenciación masiva, las variantes asociadas a resistencia minoritarias presentes en la IN del VIH-2, se identificó, exclusivamente, el cambio T97A ([Storto et al., 2018](#)). Con todos estos estudios, se estableció que el VIH-2 no albergaba polimorfismos naturales en las posiciones principales asociadas a resistencia a los INI de 1ª y 2ª generación: Y143, N155, G140, Q148, G118R, R263.

### 1.9.2. Susceptibilidad del VIH-2 a los inhibidores de la integrasa (INI) y experiencia en la práctica clínica

Pese a que a nivel nucleotídico, el grado de similitud de la IN del VIH-2 con la del VIH-1 es del 40%, el 65% de los amino ácidos se encuentran conservados ([Bercoff et al., 2010](#)). Además, el grado de conservación de los motivos detallados anteriormente en los dominios de la IN es del 100%, lo que avala su crucial importancia en el correcto funcionamiento de la IN. El dominio CCD es el más conservado, a diferencia del dominio CTD, en el que se observó un mayor grado de variabilidad ([Roquebert et al., 2008b](#); [Xu et al., 2008](#); [Bercoff et al., 2010](#); [Cavaco-Silva et al., 2014](#)).

Diferentes grupos llevaron a cabo experimentos de susceptibilidad fenotípica de los INI en la supresión del VIH-2. Inicialmente, RAL y EVG mostraron ser capaces de inhibir la replicación del VIH-2 a concentraciones nanomolares, pese a la presencia de los polimorfismos naturales (Roquebert et al., 2008b). Mientras que la experiencia en el tratamiento de pacientes VIH-2+ con RAL es relativamente amplia, hasta el 2018 sólo existía un estudio que describiese una respuesta exitosa a EVG en un sujeto con VIH-2 (Zheng et al., 2014).

En el año 2008 se caracterizaron los dos primeros pacientes VIH-2+ en los que, tras un fracaso virológico (FV) a TARGA basado en RAL, se seleccionaron variantes asociadas a resistencia previamente observadas en la IN del VIH-1. Estas fueron Q148R y N155H. Además, en el primer aislado se confirmaron altos niveles de resistencia a RAL (Roquebert et al., 2008a) (Garrett et al., 2008). Un año más tarde, se confirmaría también la emergencia de Y143C en este mismo contexto (Xu et al., 2009), siendo entonces evidente el elevado grado de similitud entre los patrones genotípicos de resistencia a los INI por los dos tipos de VIH. Con respecto a las mutaciones secundarias implicadas en la resistencia a RAL en la IN del VIH-2, se identificaron tanto cambios nuevos, como otros previamente asociados a resistencia en el VIH-1. Entre los primeros, destacó la presencia de I84V, junto a la vía principal N155H (Salgado et al., 2009; Cavaco-Silva et al., 2014; Treviño et al., 2015), así como la mutación Q91R, (Bercoff et al., 2010; Xu et al., 2009; Cavaco-Silva et al., 2014). Entre las sustituciones descritas anteriormente en la IN del VIH-1, fue frecuente la identificación de T97A y E92Q (Xu et al., 2009; Charpentier et al., 2011) y esporádica la de S147G (Xu et al., 2009), V151I y 232N (Cavaco-Silva et al., 2014). También se seleccionó A153G, un cambio distinto a la mutación S153Y/F en VIH-1 (Shafer, 2006).

Por otro lado, hasta el año 2017 sólo se habían publicado dos trabajos que analizaran la respuesta a DTG en sujetos VIH-2+ con FV previo a RAL, en los que, además, no se identificaron nuevos cambios asociados a resistencia (Descamps et al., 2015; Treviño et al., 2015). Sin embargo, sí se han llevado a cabo estudios de susceptibilidad fenotípica in vitro a DTG, CAB y BIC, tanto en las cepas salvajes como en aislados de VIH-2 resistentes a los INI de 1ª generación. Los resultados indicaron que el VIH-2 presenta una susceptibilidad muy similar a la exhibida para el VIH-1 (Charpentier et al., 2010; Smith et al., 2015; Smith et al., 2018a; Tsiang et al., 2016; Smith et al., 2018b, Hingrat et al., 2018).

## OBJETIVOS

---

Esta tesis persigue proporcionar conocimiento en el ámbito clínico de los pacientes infectados por VIH-2, incluyendo situaciones especiales como la coinfección con VIH-1 o la presencia de resistencias a los antirretrovirales.

**Objetivo 1:** Analizar la respuesta al tratamiento antirretroviral en los pacientes coinfectados por VIH-1 y VIH-2 que residen en España.

- Conocer la prevalencia y características principales de los sujetos coinfectados por VIH-1 y VIH-2 en nuestro país.
- Evaluar la respuesta virológica e inmunológica al tratamiento antirretroviral en los pacientes coinfectados por VIH-1+VIH-2.

**Objetivo 2:** Describir la experiencia clínica con inhibidores de la integrasa en pacientes infectados por VIH-2 en España.

- Analizar la respuesta al tratamiento antirretroviral basado en inhibidores de la integrasa en pacientes con infección por VIH-2.
- Comparar las tasas de respuesta a los inhibidores de la integrasa en pacientes “naive” y pretratados.
- Describir los patrones de resistencia a los inhibidores de la integrasa en pacientes infectados por VIH-2 con fracaso terapéutico.

**Objetivo 3:** Analizar la resistencia a raltegravir y su impacto en la respuesta a dolutegravir en pacientes infectados por VIH-2.

- Analizar las mutaciones asociadas a resistencia en el gen de la integrasa en VIH-2 en pacientes que fracasaron a terapias basadas en raltegravir.
- Caracterizar las mutaciones asociadas a resistencia a dolutegravir en el gen de la integrasa del VIH-2.

## **PACIENTES Y MÉTODOS**

---

### 3.1. Grupo español de estudio de la infección por VIH-2

El grupo español de estudio de la infección por VIH-2 se fundó en 1989. En la actualidad, participan más de 60 hospitales españoles y centros de diagnóstico microbiológico, ubicados a lo largo de toda la geografía española (**Figura 9 y Tabla 2**). De forma anual, en el mes de diciembre, el grupo celebra una reunión en la que se actualizan los datos de la infección por VIH-2 en España. A lo largo de la reunión, se comunican los nuevos casos y se comparte la experiencia diagnóstica y clínica de los mismos. Entre los objetivos del grupo destacan conocer la epidemiología de la infección por VIH-2 en España, evaluar la respuesta al tratamiento antirretroviral de estos pacientes y analizar los patrones de resistencias característicos de la infección por VIH-2. Además, el grupo trabaja en la redacción de recomendaciones clínicas y diagnósticas basadas en su experiencia.

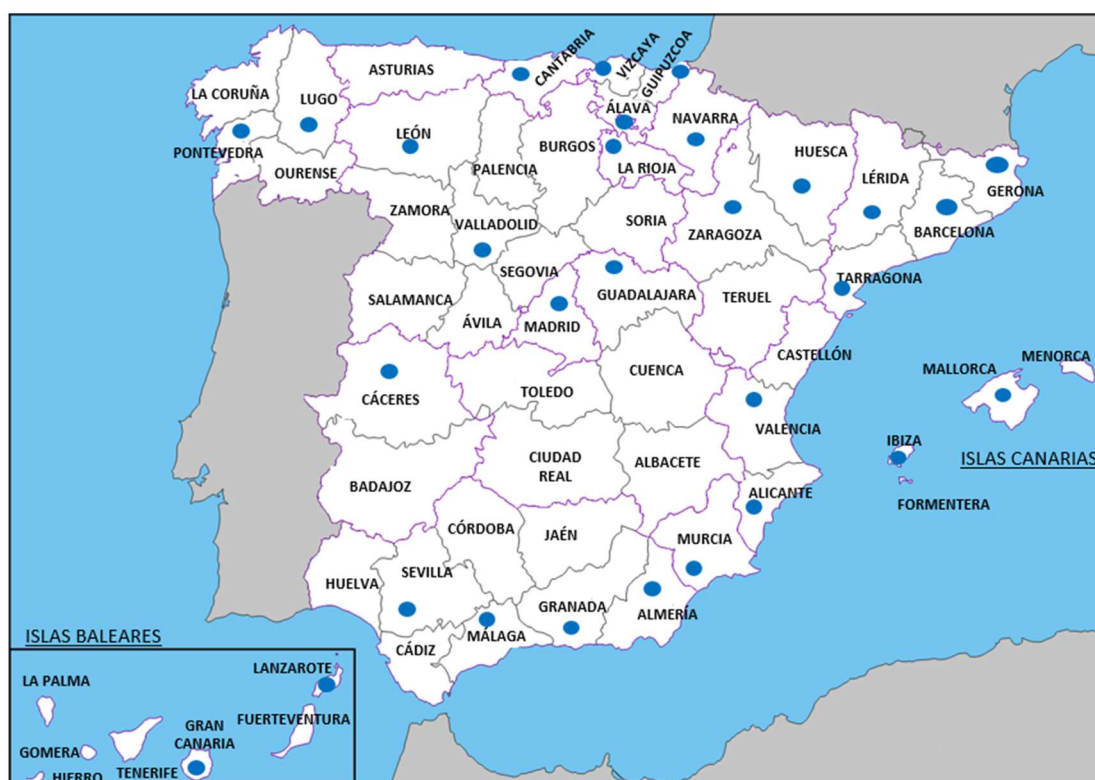
Habitualmente, tras un diagnóstico de infección por VIH-2 y su comunicación al paciente, se realiza una extracción de sangre en un tubo EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid), que es enviado al laboratorio de referencia de infección por VIH-2, en el Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda (HUPHM). En este laboratorio, perteneciente al servicio de medicina interna, se recepcionan, procesan y analizan las muestras. Para una correcta monitorización de la infección, el grupo tiene puesto a punto un ensayo de RT-qPCR no comercial que permite cuantificar la viremia. Además, en aquellos pacientes en los que se detecta replicación activa a nivel plasmático durante el seguimiento, se procede a la amplificación de los genes diana del VIH-2 para el estudio de resistencias.

Ante un nuevo diagnóstico de infección por VIH-2, el médico o microbiólogo del hospital cumplimenta una hoja de registro de casos, que se remite al laboratorio de medicina interna del HUPHM. Entre los datos cumplimentados en esta hoja figuran:

- Datos demográficos: edad, sexo, país de origen y raza.
- Datos epidemiológicos: posible ruta de infección, estancias o visitas a otros países, tiempo de residencia en España, relaciones con personas de áreas endémicas, etc.
- Datos clínicos: número de linfocitos T CD4+, coinfección por VIH-1, clínica asociada a infección por VIH, tratamiento antirretroviral.

El registro de casos lleva asociada una colección de muestras que permite el análisis de la CV y estudio de resistencias cuando es necesario.

**Figura 9.** Provincias a las que pertenecen los centros hospitalarios y/o diagnósticos integrantes del grupo español de estudio de la infección por VIH-2.



**Tabla 2.** Hospitales y centros españoles miembros del grupo español de estudio de la infección por VIH-2.

<u>Comunidad Autónoma</u>	<u>Hospital</u>
<b>Comunidad de Madrid</b>	Hospital General Universitario Gregorio Marañón
	Hospital Universitario La Paz
	Hospital Universitario de Móstoles
	Hospital Universitario de Fuenlabrada
	Hospital Universitario del Henares
	Hospital Universitario Clínico San Carlos
	Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz
	Hospital Universitario Infanta Leonor
	Hospital Universitario de Getafe
	Hospital Universitario Severo Ochoa
	Hospital Universitario Príncipe de Asturias
	Hospital Universitario Infanta Sofía
	Centro de transfusiones de la Comunidad de Madrid
	Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro-Segovia de Arana
<b>Cantabria</b>	Hospital Universitario Marqués de Valdecilla
<b>Navarra</b>	Complejo Hospitalario de Navarra
<b>La Rioja</b>	Complejo Hospitalario San Millán-San Pedro
<b>Región de Murcia</b>	Hospital Universitario Los arcos del Mar Menor
<b>Extremadura</b>	Hospital San Pedro de Alcántara



<b>Cataluña</b>	Barcelona	Hospital Vall d'Hebron
		Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
		Hospital Clinic Barcelona
		Hospital Parc Taulí de Sabadell
		Hospital Bellvitge
		Hospital de Mataró
		Hospital Vilafranca del Penedès
		Hospital General de l'Hospitalet
		Banco de Sangre y Tejidos de Cataluña
	Tarragona	Hospital Universitario Sant Joan Reus
		Hospital Universitario Joan XXIII
	Lérida	Hospital Universitario Arnau de Vilanova
	Gerona	Hospital Universitario de Gerona Doctor Josep Trueta
<b>Andalucía</b>	Sevilla	Hospital Universitario Virgen Macarena
	Málaga	Hospital Costa del Sol Marbella
		Hospital Universitario Virgen de la Victoria
	Almería	Hospital de Poniente
		Complejo Hospitalario Torrecárdenas
	Granada	Hospital Clínico Universitario San Cecilio
<b>Castilla-La Mancha</b>	Guadalajara	Hospital Universitario de Guadalajara
<b>Castilla y León</b>	Valladolid	Hospital Clínico Universitario de Valladolid
		Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León
	León	Hospital Universitario de León
		Hospital del Bierzo
<b>Galicia</b>	Lugo	Hospital Universitario Lucus Augusti
	Pontevedra	Complejo Hospitalario Universitario de Pontevedra
		Hospital Álvaro Cunqueiro
		Hospital Meixoeiro
<b>País Vasco</b>	Vizcaya	Hospital Universitario Basurto
		Hospital Universitario Cruces
	Guipúzcoa	Hospital Nuestra Señora de Aránzazu
		Hospital Universitario Donostia
	Álava	Hospital Universitario Araba
<b>Comunidad de Aragón</b>	Zaragoza	Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa
		Hospital Universitario Miguel Servet
	Huesca	Hospital de Barbastro
<b>Comunidad Valenciana</b>	Valencia	Hospital General Universitario de Valencia
		Hospital Universitario y Politécnico de la Fe
	Alicante	Hospital General Universitario de Alicante
<b>Islas Baleares</b>	Mallorca	Hospital Comarcal de Inca
		Hospital Universitario Son Espases
		Hospital Son Llätzer
	Ibiza	Hospital Can Misses
<b>Islas Canarias</b>	Gran Canaria	Hospital Universitario Insular de Gran Canaria
	Lanzarote	Hospital Doctor José Molina Orosa

### 3.2. Procesamiento de las muestras y almacenamiento

Una vez recibido el tubo EDTA, el plasma fue separado mediante una centrifugación a 2.500 rpm durante 5 minutos y posteriormente, almacenado en criotubos a -20°C.

La extracción de ARN se realizó de forma manual, a partir de 500 µl de plasma, mediante un kit con capacidad de extraer 12 muestras a la vez (Abbott mSample Preparation Systems RNA, Promega). El protocolo seguido fue el indicado por el fabricante. El ARN eluido resultante, en un volumen de 88 µL se almacenó nuevamente a -20°C hasta el momento de la preparación del ensayo de cuantificación.

### 3.3. Cuantificación de carga viral (CV) de VIH-2

Este ensayo de RT-PCR a tiempo real, no comercial, se llevó a cabo según un diseño descrito anteriormente ([Ferns and Garson, 2006](#)), de acuerdo a la elección del gen diana y los cebadores y sondas elegidos para tal fin. Así, se amplificó la región del LTR del VIH-2, debido a pruebas previas que demostraron la presencia de regiones muy bien conservadas y que además permitían la amplificación de ambos subtipos mayoritarios de VIH-2: A y B. Sin embargo, se hicieron algunas modificaciones que enumeraré a continuación:

- En el ensayo original, se extrajeron 140 µl de plasma o estándar, mientras que, para la realización de los estudios citados en esta tesis, se usaron 500 µl.
- El estándar del que partieron los autores en el ensayo original se obtuvo a partir del sobrenadante resultante tras el cultivo del aislado CBL22, junto con la línea linfoblastoide de células T humanas cutáneas, H9. En este caso, usamos un lisado viral purificado a concentración conocida: “HIV-2 (NIH-Z Strain) Purified viral lysate”, (Advanced Biotechnologies, Columbia, Maryland, EEUU), preparado y obtenido a una concentración de  $7,2 \times 10^{10}$  partículas virales/mL.
- El rango de detección de copias, en el caso del protocolo aquí descrito, iba de  $5 \times 10^6$  a las 50 copias/mL, mientras que originalmente, este oscilaba entre  $1,8 \times 10^6$  y 18 copias.

### 3.3.1. Curva de calibración y controles positivos

#### Curva de calibración

Para la cuantificación del número de copias plasmáticas de ARN de VIH-2, en cada ensayo se amplificaron, además de las muestras, 6 diluciones de ARN de VIH-2 con número de copias conocido (curva de calibrado). Para la preparación de la curva, se contó con el estándar citado anteriormente (HIV-2 Purified viral lysate).

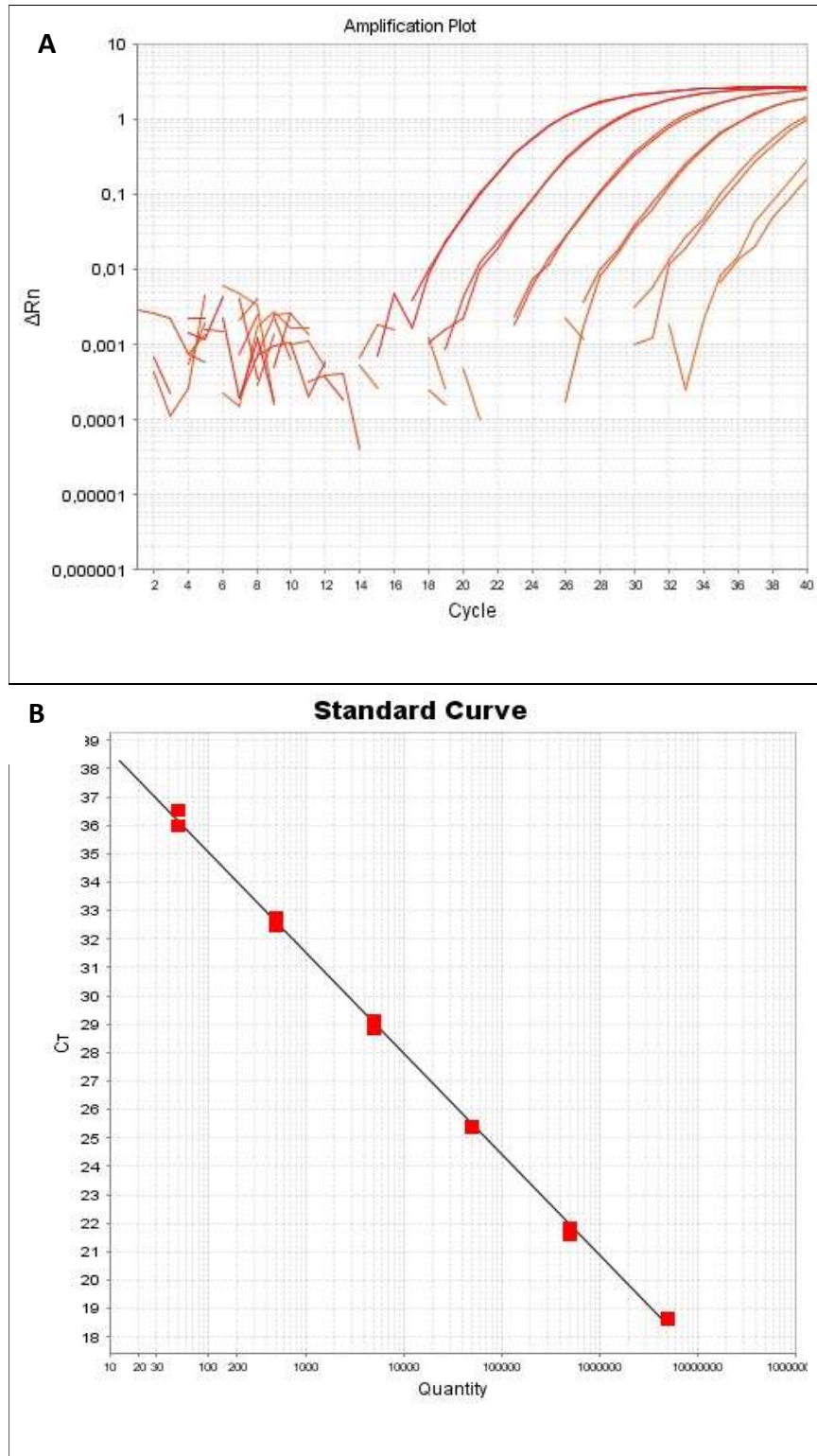
En primer lugar, se procedió a la preparación de diluciones seriadas 1/10 en PBS a partir del estándar, que fueron nombradas  $Q^9$ ,  $Q^8$ ,  $Q^7$ ,  $Q^6$ ,  $Q^5$ ,  $Q^4$  y  $Q^3$ . Con el fin de crear una curva de calibrado lo más exacta posible, se extrajo, únicamente, el ARN de la dilución  $Q_6$ , ajustado a  $5 \times 10^6$  copias/mL. A partir de esta, se realizaron 5 diluciones seriadas 1/10 en los mismos reactivos y proporciones en los que se eluyó el ARN de  $Q_6$  previamente, de acuerdo con el protocolo seguido del kit de extracción. La elección de extraer  $Q_6$  se debió al interés de cubrir el rango de  $5 \times 10^6$ -50 copias; siendo así 50 copias, el límite de detección de este ensayo. En la **Figura 10** se pueden observar las curvas de amplificación de las diluciones del estándar, así como la curva de calibración resultante.

#### Controles positivos

Para asegurar una correcta extracción de ARN, así como para verificar el correcto desarrollo de la RT-qPCR y evaluar la degradación de las diluciones del estándar, en cada extracción, además de las muestras, se extrajeron 2 diluciones del estándar, que servían como controles positivos (CP). Estos fueron  $Q_5$  (CP- $Q_5 = 5 \times 10^5$  copias/mL) y  $Q_3$  (CP- $Q_3 = 5 \times 10^3$  copias/mL). Se consideraron desviaciones significativas en la curva de calibración cuando los controles  $Q_3$  y/o  $Q_5$  presentaran diferencias superiores a 0,5 log respecto al valor esperado: 3,7 o 5,7 log copias/mL, respectivamente.

Además de esta premisa, el propio programa en el que se llevó a cabo el ensayo, 7500 Software v2.0.6, daba unos valores de evaluación de la recta. Entre estos estaban la pendiente, un valor  $R^2$  y un porcentaje de eficiencia. Aproximadamente, cada dilución debía distar 3,5 CT de la anterior.

**Figura 10.** Curvas de amplificación de las diluciones del estándar y curva de calibración resultante.



**A.** Eje X: 40 ciclos de amplificación establecidos para el ensayo. Eje Y: variación de logaritmo ( $\Delta Rn$ ). De izquierda a derecha aparecen las curvas de amplificación de Q<sub>6</sub>, Q<sub>5</sub>, Q<sub>4</sub>, Q<sub>3</sub>, Q<sub>2</sub> y Q<sub>1</sub>. **B.** Eje X: nº de copias de ARN de VIH-2/mL. Eje Y: ciclos de amplificación (CT). Los cuadrados rojos indican el nº de copias y el CT de cada una de las diluciones del estándar. De izquierda a derecha son Q<sub>1</sub>, Q<sub>2</sub>, Q<sub>3</sub>, Q<sub>4</sub>, Q<sub>5</sub> y Q<sub>6</sub>.

### 3.3.2. Condiciones de amplificación

Cada reacción llevada a cabo en el ensayo se realizó por duplicado, tanto en el caso de las muestras como en la curva de calibrado. Los reactivos, volúmenes y concentraciones empleados en la reacción de amplificación fueron los siguientes:

Reacción de la RT-qPCR		Condiciones de la RT-qPCR		
	<u>x 1</u>	Temperatura	Tiempo	Ciclo
Buffer	12.5 µl	45°C	10 min	1
Cebador HIV-2F (10 µM)	1 µl	95°C	10 min	1
Cebador HIV-2R (10 µM)	1 µl	95°C	15 seg	40
Enzima RT	1 µl	60°C	45 seg	
Sonda VIH-2	2 µl			
H <sub>2</sub> O	2.5 µl			
ARN	5 µl			
Volumen total	25 µl			

El buffer de amplificación y la enzima RT utilizados fueron: AgPath-ID One Step RT-PCR (Life Technologies). Las secuencias de los cebadores (Invitrogen Custom Primers - Illumina) y de la sonda empleada (Life Technologies-Applied Biosystems) aparecen descritos en la **Tabla 3**. Esta tabla también recoge todas las secuencias de los cebadores empleados en la amplificación de los genes de interés del VIH-2 que se detallarán en el siguiente apartado. Este ensayo se montó en microplacas de 96 pocillos (MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate, de Applied Biosystems) y se llevó a cabo en el equipo ABI 7500 Real Time PCR System (también de Applied Biosystems). El programa utilizado fue el 7500 Software v2.0.6.

Tabla 3. Secuencias de los cebadores y sonda empleados en esta tesis.

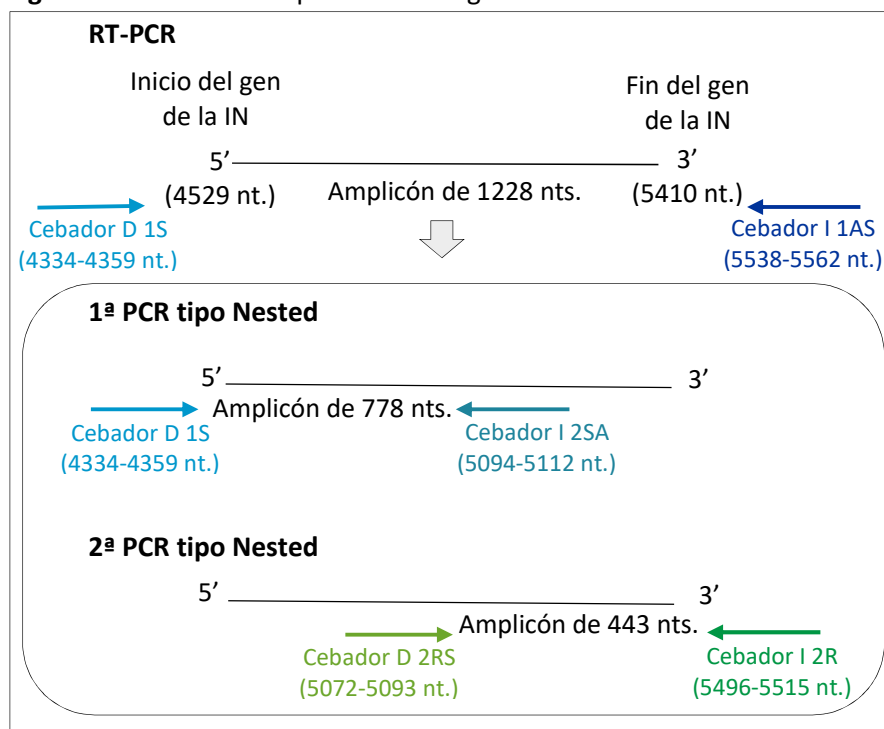
Región	PCR	Nombre (D/I)	Secuencia 5' → 3'	Origen
LTR	RT-qPCR	HIV-2F (D)	GCAGGTAGAGCCTGGGTGTTCC	Ferns y Garson, 2006
		HIV-2R (I)	CTTGCTTCTAATCTGGCAGCTTTATT	
		Sonda FAM-TAMRA	TGGGCAGATCGGCTCCACGC	
IN	RT-PCR	1S (D)	ATAGTAGACTCACARTATGTMATGGG	Roquebert y colaboradores, 2008
		1AS (I)	RGTTCCAATATSCYTGTAYCTCTAG	
	Nested y secuenciación	1S (D)	ATAGTAGACTCACARTATGTMATGGG	
		2SA (I)	GTCATATCCCTTATTCCTC	
		2RS (D)	TGCATGAATTTTAAAAAGAGGG	
		2R (I)	AATATTACYCTRCTGCAAGT	
RT	RT-PCR	EFRT2 (D)	AAGCCAGGGAAAGATGGACC	Laboratorio de medicina interna del HUPHM
		ERRT2 (I)	GGCCAKAGCTCATAGCCCATC	
	Nested y secuenciación	IFRT2 (D)	CAATGGCCYTTAAACAAAAGA	
		IRRT2 (I)	ATCCATTKGTATGGAGGGTC	
		DP20 (D)	GACAGAGGACTTGCTGCA	
PR subtipo A	RT-PCR	DP21 (I)	GGCCATTGTCTCAGTTTGG	Otten y colaboradores, 1999
		DP26 (D)	CACCTCAATTCTCTCTTTGGA	
	Nested y secuenciación	DP27 (I)	TAGATTTAATGACATGCCTAA	
		PREF (D)	CCCCCTGCAGATCCAGCAG	
		PRER (I)	CACAGATTTCTTTGAGGGC	
PR subtipo B	RT-PCR	PRIF (D)	GGAGGTGACAGAGGAYTTGC	Laboratorio de medicina interna Hospital Carlos III
		PRIR (I)	GGCCATTGTCTGATYTTTG	
	Nested y secuenciación			

D: hace referencia al cebador directo; I: hace referencia al cebador inverso.

### 3.4. Análisis de resistencias al tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) en la infección por VIH-2

Para el análisis de mutaciones de resistencias en el VIH-2, se realizó la amplificación de los genes de la RT, PR e IN. Con este fin se realizó una RT-PCR seguida de una PCR tipo nested, en la que se añadió el amplicón obtenido en la RT-PCR. En el caso del gen de la IN, el amplicón resultante se amplificó en dos partes, mediante 2 PCR tipo nested independientes y su diseño aparece reflejado en la **Figura 11**. Las condiciones que se usaron en ambas PCRs fueron las estándar. Las temperaturas de anillamiento fueron 50°C para la PCR tipo nested de la RT y 55°C en todas las demás. Los cebadores empleados en la amplificación del gen de la RT y de la PR de los subtipos B fueron diseñados por miembros del grupo español de estudio de la infección por VIH-2, mientras que los utilizados para la amplificación de la IN y de la PR de subtipos A aparecen descritos en otros trabajos, como muestra la **Tabla 3**. Los termocicladores usados fueron GeneAmp PCR System 2700 y 2720 Thermal Cycler (ambos de Applied Biosystems).

**Figura 11.** Diseño de amplificación del gen de la IN del VIH-2.



Las reacciones aparecen a continuación, donde D hace referencia al cebador directo e I al inverso:

Reacción de RT-PCR		Reacción de PCR tipo nested	
	<u>x 1</u>		<u>x 1</u>
AccessQuick Master Mix	25 µl	PCR Master Mix	25 µl
AMV RT	1 µl	Cebador D (10 µM)	1 µl
Cebador D (10 µM)	1 µl	Cebador I (10 µM)	1 µl
Cebador I (10 µM)	1 µl	H <sub>2</sub> O	18 µl
H <sub>2</sub> O	12 µl	cADN	5 µl
ARN	10 µl		
Volumen total	50 µl	Volumen total	50 µl

### 3.5. Detección, purificación y secuenciación del amplicón

Para la detección del amplicón se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 1x. Tras la visualización de las bandas con el tamaño esperado, el amplicón se purificó (QIAquick PCR Purification Kit, de QUIAGEN, Alemania) y se llevó a cabo la PCR de secuenciación, con los cebadores internos empleados en la PCR tipo nested, pero a una concentración de 3,2 µM. Los reactivos empleados fueron el BigDye Terminator v1.1, v3.1 5X Sequencing Buffer, de Applied Biosystems, (Reino Unido) y el BigDye Terminator v1.1 Cycle, de Applied Biosystems (EEUU). La reacción y condiciones fueron las siguientes:

Reacción de PCR de secuenciación		Condiciones de PCR de secuenciación		
	<u>x 1</u>	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Big dye	1 µL	96°C	1 min	1
Buffer	1.5 µL	96°C	10 seg	25
Cebadores D / I (3,2 µM)	1 µL	50°C	5 seg	
H <sub>2</sub> O	5.5 µL	60°C	4 min	
Producto purificado	1 µL	4°C	∞	
Volumen total	10 µL			



### 3.6. Análisis de las secuencias e interpretación de los datos

El producto obtenido tras la reacción de secuenciación fue precipitado con etanol y acetato de sodio. El análisis de la reacción de secuenciación se hizo en el secuenciador automático de 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EEUU), que permitía detectar variantes que estuviesen representadas en más de un 20% de las cuasiespecies virales.

Las secuencias obtenidas fueron cargadas en proyectos creados en SeqScape v2.5: uno de PR, otro de RT y uno tercero de IN. En el caso de la IN, se crearon dos proyectos, uno para las secuencias pertenecientes a subtipos A, con la secuencia de referencia del aislado de referencia ROD y otro para los subtipos B, con la secuencia de referencia del aislado EHO.

Para la identificación del subtipo de VIH-2, se exportaba la secuencia de cualquiera de los genes amplificados en formato FASTA, a partir del SeqScape, y se cargaba en la página de HIV-2 EU (URL: <http://www.hiv-grade.de/HIV2EU/deployed/grade.pl?program=hivalg>). Además de la identificación del subtipo, el programa informaba del porcentaje de similitud con el subtipo relacionado y también se indicaban e interpretaban las variantes asociadas a resistencia. En el análisis de la secuencia de la IN, las siguientes posiciones fueron analizadas: 51, 66, 74, 92, 95, 97, 114, 121, 128, 138, 140, 143, 145, 146, 147, 148, 151, 153, 155, 157, 163, 230 y 263, de acuerdo con la base de datos de resistencia de Standford para el VIH-1 (Shafer, 2006) y el panel americano de mutaciones de la Sociedad internacional del SIDA (Wensing et al., 2015).

# RESULTADOS



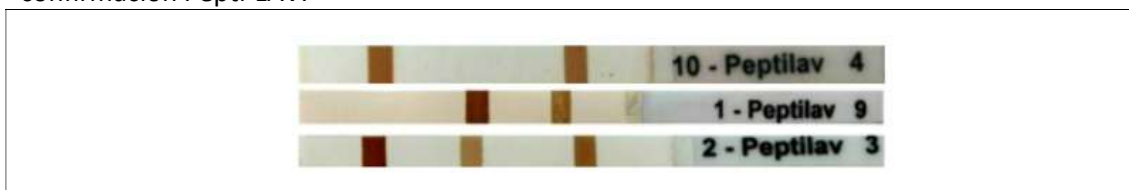
#### **4.1. Respuesta al tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) de los pacientes coinfectados por VIH-1 y VIH-2 que residen en España**

##### **4.1.1. Diagnóstico de la coinfección por VIH-1 y VIH-2 en España**

se identificaron, de forma retrospectiva, todos los individuos infectados por VIH-2 que estaban coinfectados por VIH-1, incluyendo todos los casos identificados desde enero de 1989 hasta diciembre de 2018. Actualmente, como se ha comentado en la introducción de esta tesis, el diagnóstico de VIH se realiza a partir de un primer ensayo de cribado de 4ª generación. Las muestras reactivas son posteriormente testadas en un ensayo serológico con capacidad de discriminación entre los anticuerpos de VIH-1 y de VIH-2. Con el fin de discriminar entre reactividad cruzada y una coinfección real por ambos tipos de VIH, las muestras en las que se obtuvo doble reactividad fueron posteriormente diluidas y testadas nuevamente con este ensayo discriminatorio. Cuando la reactividad de los anticuerpos de ambos virus se conservaba, se trataba de infecciones duales verdaderas (coinfección), mientras que aquellas muestras en las que se perdía la doble reactividad, no constituían casos de coinfección por VIH-1 y VIH-2 ([Soriano et al., 1996](#)).

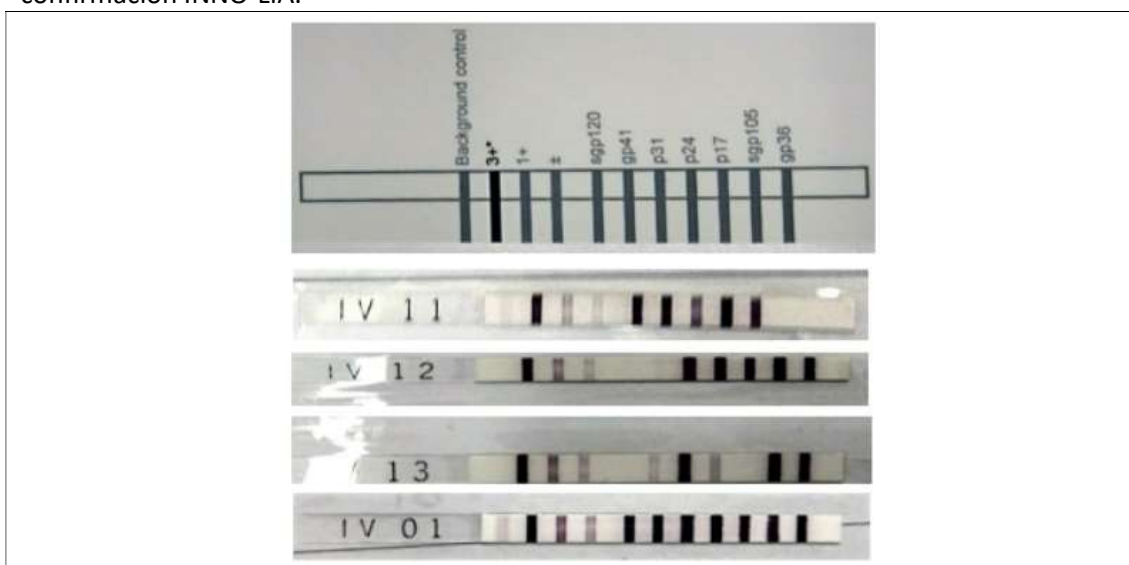
Debido al amplio periodo en el que se hicieron los diagnósticos, el método confirmatorio y discriminatorio, varió. En un primer momento se hizo Pepti-LAV (Diagnostic Pasteur, Paris, Francia y BIO-RAD, Marnes-la-Coquette, Francia), un inmunoensayo en tira en el que únicamente se podían detectar anticuerpos frente a los antígenos (péptidos sintéticos) de las proteínas de transmembrana de la envuelta gp41 (VIH-1) y gp36 (VIH-2). Posteriormente y hasta la actualidad, se empezó a usar INNO-LIA HIV I/II Score (Fujirebio Europe, Ghent, Bélgica), otro inmunoensayo en tira basado en péptidos sintéticos y proteínas recombinantes, que discrimina entre anticuerpos frente a un mayor número de antígenos del VIH-1, incluyendo VIH-1 grupo O (“outlier”) y VIH-2. Estos son: para VIH-1, sgp120 (glicoproteína de superficie de la envuelta), gp41 (glicoproteína transmembrana de la envuelta), p31 (IN), p24 (cápside) y p17 (matriz), y para VIH-2, sgp105 (glicoproteína de superficie de la envuelta) y gp36 (glicoproteína de transmembrana de la envuelta). En las **Figuras 12 y 13** se muestran las tiras con reactividad positiva del Pepti-LAV y el INNO-LIA de pacientes con monoinfección por VIH-1, por VIH-2 y por VIH-1 + VIH-2. La interpretación de los resultados se hizo de acuerdo a lo indicado por los fabricantes. De modo resumido, sólo quedaban diagnosticados como seropositivos para VIH-1 o VIH-2, aquéllos individuos en cuyas muestras había reactividad, en al menos, ambas bandas de la envuelta (VIH-1: sgp 120 y gp41 o VIH-2: sgp105 y gp36).

**Figura 12.** Reactividad e interpretación de los resultados observados en el ensayo de confirmación Pepti-LAV.



De arriba abajo: Muestra con reactividad positiva a VIH-1, muestra con reactividad positiva a VIH-2, muestra con reactividad positiva a VIH-1 y VIH-2. Bandas de izquierda a derecha (tira 2-Peptilav 3): reactividad frente a antígeno gp41, frente a gp36 y banda control.

**Figura 13.** Reactividad e interpretación de los resultados observados en el ensayo de confirmación INNO-LIA.



De arriba abajo: Tira de muestra con todas las líneas: de control, de grado de positividad y de reactividad a antígenos del VIH-1 (sgp120, gp41, p31, p24 y p17) y del VIH-2 (sgp105 y gp36). Debajo aparecen ejemplos de muestras con reactividad positiva a VIH-1 (tira 11), a VIH-2 (tiras 12 y 13) y a ambos, VIH-1 y VIH-2 (tira 01).

La viremia plasmática del VIH-1 se examinó usando ensayos de CV comerciales, mientras que los niveles plasmáticos del ARN de VIH-2 se cuantificaron a través del ensayo a tiempo real de reacción en cadena de la polimera (qRT-PCR) no comercial, que aparece descrito en la sección de “Pacientes y Métodos” de esta tesis.

Para la caracterización de los sujetos coinfectados se recogieron los siguientes datos: año de diagnóstico, género, país de origen, grupo de riesgo, presencia de enfermedades definitorias de SIDA, viremia basal, recuento de linfocitos T-CD4+, subtipo de VIH, terapia antirretroviral y presencia de infecciones crónicas por VHB o VHC.

El análisis estadístico se llevó a cabo con la versión 20.0 del SPSS (IBM, España). Las variables cuantitativas principales aparecen descritas en número y porcentaje, o mediana y rango intercuartílico (RIC). La CV se transformó en logaritmos de base 10. Los niveles basales (previos al inicio del TARGA) de ARN plasmáticos del VIH-2 y el recuento de linfocitos T-CD4+ de los sujetos monoinfectados por VIH-2 incluidos en el registro español se usaron para su comparación con los individuos coinfectados. El test de la U de Mann-Whitney se usó para las variables que no seguían una distribución normal. El test de la t de Student se utilizó para las variables con distribución normal.

#### **4.1.2. Características epidemiológicas de los pacientes con coinfección por VIH-1 y VIH-2**

Hasta diciembre de 2018, había 373 personas confirmadas con infección por VIH-2 y cuyo diagnóstico había sido comunicado al registro español de infección por VIH-2. De todas ellas, había 34 (9,1%) que estaban además coinfectadas por VIH-1. Sin embargo, sólo en 10 (31,2%) sujetos se pudo detectar, al menos en una ocasión durante todo el seguimiento, el ARN de ambos tipos de VIH. De los 9 pacientes que fueron diagnosticados antes del año 2000, no había muestras de plasma disponible para cuantificar los niveles de ARN de VIH-2 mediante ensayos sensibles y precisos. La confirmación usando ADN proviral se hizo en 5 casos más.

Como se muestra en la **Tabla 4**, los hombres representaban un 67,6% de los individuos coinfectados. La mediana de edad fue 39 años, y eran significativamente más jóvenes que las personas monoinfectadas por VIH-2 (43 años;  $p=0,035$ ). La mayoría de los pacientes procedían de países del Occidente de África (70,6%), aunque 6 de ellos (17,6%) eran españoles nativos. Además, 6 personas procedían de otros países africanos y había, además, un francés y un brasileño. En el momento del diagnóstico, 9 (26,5%) padecían enfermedades definitorias de SIDA.

**Tabla 4.** Principales características epidemiológicas de los individuos coinfectados VIH-1+VIH-2.

	<b>Pacientes coinfectados por VIH-1+VIH-2</b>	<b>Pacientes monoinfectados por VIH-2</b>	<b>P</b>
<b>N</b>	34	339	---
<b>Hombre, n (%)</b>	23 (67,6)	213 (6,8)	n.s.
<b>Mediana de edad en el diagnóstico (RIC)</b>	39 (17,5)	43 (16)	0,035
<b>Grupo de riesgo, n (%)</b>			
Heterosexual	29 (85,3)	212 (62,5)	0,04
Hombre homosexual	2 (5,9)	13 (3,8)	---
Vertical	0	6 (1,8)	---
Otros / desconocido	4 (11,8)	108 (31,8)	---
<b>País de origen</b>			
<b>España</b>	6 (17,6)	49 (14,4)	n.s.
<b>Países de África Occidental</b>	24 (70,6)	200 (59)	
Guinea Bissau	9	72	
Senegal	4	54	
Gambia	3	15	
Liberia	2	0	
Costa de Marfil	1	10	
Ghana	1	14	
Guinea Ecuatorial	2	13	
Camerún	2	3	
Cabo Verde	-	8	
Otros	-	11	
<b>Otros países africanos</b>	2 (5,9)	82 (24,2)	
Mozambique	1	1	
Otros países subsaharianos	1	81	
<b>Otros países</b>	2 (5,9)	18 (5,3)	
<b>Subtipos de VIH-2*</b>			
A	10 (90,9)	102 (86,4)	n.s.
B	1 (9,1)	16 (13,6)	
<b>Enfermedades definatorias de SIDA</b>	9 (26,5)	49 (14,4)	0,01
<b>Niveles de ARN de VIH-2 indetectables de forma basal<sup>‡</sup></b>	9 (45)	49 (63,1)	0,02
<b>Mediana basal del recuento de la cifra de linfocitos T-CD4+ (células/<math>\mu</math>L) (RIC)</b>	204 (97-427)	445 (223-668)	<0,001

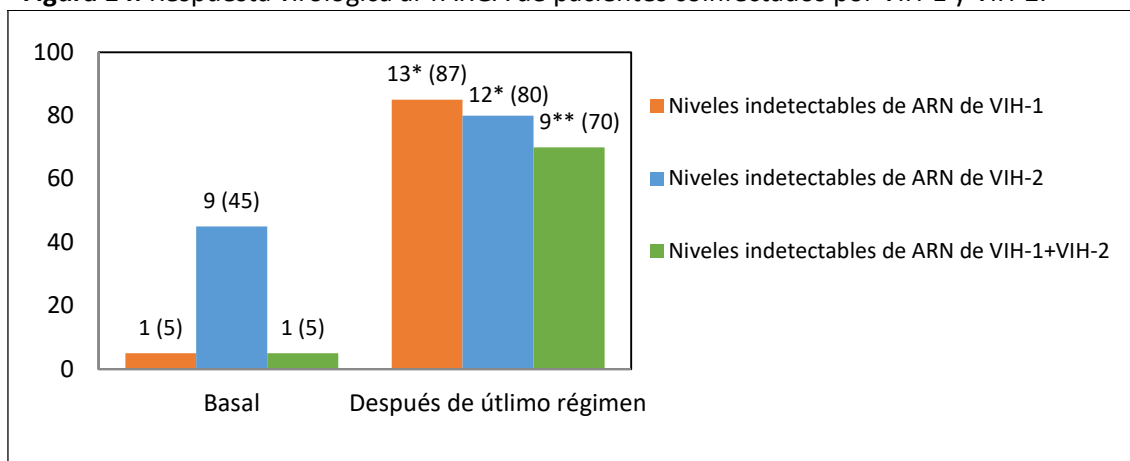
\* La información sobre el subtipo de VIH-2 estaba disponible para 11 infectados coinfectados y para 118 personas monoinfectadas por VIH-2; <sup>‡</sup> Datos disponibles en 21 pacientes coinfectados y en 212 sujetos con monoinfección por VIH-2.

El genotipado del VIH-1 y del VIH-2 pudo realizarse en 12 (4 CRF02\_AG; 3 B; 2 G; 1 D; 1 F y 1 J) y 11 pacientes (10 A y 1 B), respectivamente. En 5 de ellos se disponía de la información para ambos subtipos, que fueron: G y A (2), F y A (1), CRF02\_AG y B (1), y B y A (1), respectivamente. Además, con respecto a los demás subtipos de VIH-1, dos mujeres españolas estaban infectadas por los subtipos G y CRFAG\_02, mientras que se identificaron subtipos B en tres hombres de Brasil, Gambia y Guinea Bissau. La superinfección de VIH-1 pudo ser confirmada en una mujer que trabajaba en la prostitución y en la que se había diagnosticado infección por VIH-2 6 años antes. La coinfección por el virus de la hepatitis B (VHB), definida por la presencia persistente del antígeno de superficie (HBsAg) en el suero, se observó en 3 individuos con infección dual por VIH-1+VIH-2. Dos de ellos procedían de Guinea Bissau y el tercero era senegalés. La infección crónica por el virus de la hepatitis C (VHC), se demostró en un único individuo de Guinea Bissau.

#### **4.1.3. Respuesta al tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) de los pacientes coinfectados**

Antes de la administración de la terapia antirretroviral, la mediana del recuento de los linfocitos T-CD4+ en los pacientes coinfectados era 204 (97-427) células/ $\mu$ L, significativamente más baja que la observada en los sujetos con monoinfección por VIH-2 (445 [223-668] células/ $\mu$ L;  $p < 0,001$ ). De forma basal, la CV era indetectable en el 5% de los pacientes para el VIH-1 y en el 45% para VIH-2. La media de los niveles de ARN en los sujetos en los que no había una supresión virológica fue 4,9 y 3,7 log copias/mL, respectivamente.

La información de la terapia antirretroviral prescrita se pudo obtener en 20 individuos. Los regímenes basados en IP potenciado se administraron en 13 sujetos (7 LPV, 3 DRV, 1 ATV, 1 FPV y 1 IDV). Tres pacientes fueron tratados con INI (DTG), otros tres con INI junto con un IP potenciado (RAL + DRV) y uno con Trizivir® (ABC+3TC+ZDV). De forma global, la media de seguimiento en terapia antirretroviral fue  $33,5 \pm 26,8$  meses. En la última visita, la mediana del conteo de linfocitos T-CD4+ fue 418 (190-739) células/ $\mu$ L. Además, con respecto a los valores basales, el porcentaje de pacientes con menos de 200 CD4 descendió al 22% tras el inicio de la terapia antirretroviral, mientras que más del 50% tenía cifras superiores a las 500 células/ $\mu$ L. Al final del seguimiento, se observaron niveles indetectables de ARN de VIH en el 86,7% y 80% para el VIH-1 y el VIH-2, respectivamente. La supresión viral para ambos virus se observó en un 70% (Figura 14).

**Figura 14.** Respuesta virológica al TARGA de pacientes coinfectados por VIH-1 y VIH-2.

\* Dato sobre 15 pacientes.

\*\*Dato sobre 13 pacientes.

## 4.2. Experiencia clínica con los inhibidores de la integrasa (INI) en sujetos infectados por VIH-2 que residen en España

### 4.2.1. Selección de pacientes, técnicas empleadas y criterios metodológicos

Para la evaluación clínica, inmunológica y virológica de los pacientes que recibían TARGA basados en los INI actualmente aprobados en pacientes infectados por VIH-2 (RAL, EVG y DTG), se tuvieron en cuenta tanto aquéllos sujetos que iniciaron la terapia antirretroviral con un régimen basado en INI (pacientes “naïve”), como aquéllos otros que tomaron el INI tras la administración previa de combinaciones basadas en IP potenciados (pacientes pretratados o experimentados). En ambos grupos se consideraron los regímenes prescritos hasta diciembre de 2017.

Virológicamente, se consideraron pacientes con buena respuesta a los regímenes basados en INI, aquéllos que mantuvieran una CV plasmática indetectable durante la toma de esta combinación (estando ya de forma basal suprimidos), así como los sujetos que la alcanzasen, bien durante todo el seguimiento del estudio o durante un tiempo. En los casos en los que se detectó viremia durante el periodo de seguimiento, se procedió al estudio de resistencias a los fármacos incluidos en la combinación.

Desde un punto de vista inmunológico, se evaluaron variaciones en la cifra de linfocitos T-CD4+, si bien no se consideró ningún límite que estableciese una mejor o peor respuesta. Esta decisión se tomó por el limitado nº de pacientes y su seguimiento irregular.

Los resultados se expresaron en su mayoría como mediana acompañada del rango intercuartílico (RIC). Los valores representaban valores absolutos y sus porcentajes. Con el fin



de comparar las características basales y de respuesta de ambos grupos de pacientes (“naïve” y “experimentados”), se realizó el test de  $\chi^2$  o el test exacto de Fisher. Dichos análisis estadísticos se realizaron con el SPSS versión 20.0 (IBM, España).

Las técnicas que se llevaron a cabo se desarrollaron de acuerdo a lo descrito en la sección de “Pacientes y Métodos” de esta tesis y fueron: cuantificación de la CV plasmática del VIH-2 y amplificación (RT-PCR y PCR tipo nested) y secuenciación de la IN, PR y RT.

#### 4.2.2. Características principales de la población de estudio

De 354 individuos registrados en el grupo español de estudio del VIH-2 hasta diciembre de 2017, 44 (12,4%) fueron tratados con un TARGA que incluía INI. En 18 (41%) de ellos esta combinación constituyó su primer tratamiento antirretroviral, mientras que, en 26 (59%) esta representaba una intervención de rescate tras FV previos con otras combinaciones. En la **Tabla 5** aparecen reflejadas las principales características de la población de estudio. De forma global, el 72,7% eran hombres y la mediana de edad fue 43 años. Más de un 80% procedía de países del África subsahariana y un 70% había adquirido la infección por VIH-2 por la vía heterosexual. Cinco individuos estaban además coinfectados por VIH-1. No hubo diferencias estadísticamente significativas en los datos demográficos de los pacientes pretratados y de los naïve.

**Tabla 5.** Principales características demográficas de la población infectada por VIH-2 tratada con INI.

Características	Total	Naïve	Experimentados
<b>Nº</b>	44	18	26
<b>Mediana de edad en el diagnóstico, años</b>	43 (37-50)	44,5 (38-53)	43 (34-49)
<b>Género, n (%)</b>			
Hombre	32 (72,7)	10	22
Mujer	12 (27,3)	8	4
<b>Grupo de riesgo, n (%)</b>			
Heterosexual	31 (70,5)	13	18
Homosexual	1 (2,3)	-	1
Vertical	1 (2,3)	-	1
Desconocido	11 (25)	5	6
<b>Origen, n (%)</b>			
África	36 (81,8)	14	22
España	5 (11,4)	2	3
Portugal	2 (4,5)	1	1
Brasil	1 (2,3)	1	-
<b>Año de diagnóstico, n (%)</b>			
<2014	32 (72,7)	8	24
≥2014	12 (27,3)	10	2
<b>Coinfección por VIH-1, n (%)</b>	5 (11,4)	3	2

#### **4.2.3. Respuesta al tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) basado en inhibidores de la integrasa (INI) en pacientes naïve**

De los 18 pacientes VIH-2+ que tomaron INI como primer TARGA, RAL se administró en 9, mientras que 6 recibieron EVG y 3 DTG. Todos los pacientes recibieron 2 ITIAN junto con el INI, a excepción de uno, al que además se prescribió el IP DRV potenciado con ritonavir. Las combinaciones de ITIAN más usadas fueron TDF+FTC o TDF+3TC. En la **Tabla 6** se pueden observar las combinaciones prescritas y las características clínicas de los pacientes anteriores y posteriores a la toma del TARGA basado en INI.

Anterior al inicio del TARGA, de los 18 pacientes se pudieron confirmar niveles plasmáticos de ARN de VIH-2 indetectables en 8 de ellos (44,5%). La mediana de la CV en 6 pacientes con viremia y de los linfocitos T CD4+ de forma global, fueron 3,6 log copias/mL y 264 células/ $\mu$ L, respectivamente.

Tras una mediana de seguimiento de 12 meses con el tratamiento basado en INI, se observaron niveles indetectables de replicación viral en un 89% de los pacientes (16 de 18). De aquéllos en los que se había observado replicación activa de forma basal, en 5 se consiguió la supresión, mientras que 1 no la alcanzó. No se disponía de la CV basal para el otro paciente en el que se detectó replicación activa tras la toma del INI, mientras que los pacientes en los que ya existía un control virológico previo al inicio del TARGA, lo mantuvieron. La mediana global del incremento de linfocitos T CD4+ fue 82 células/ $\mu$ L.

#### **4.2.4. Respuesta al tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) basado en inhibidores de la integrasa (INI) en pacientes pretratados**

La prescripción del TARGA basado en INI se realizó en 26 pacientes como parte de una intervención de rescate. Un total de 19 pacientes recibió RAL, 6 DTG y 1 EVG. Además, todos recibieron 2 ITIAN y 13 individuos incluyeron un IP potenciado en el nuevo régimen, siendo en la mayoría de los casos DRV/r (**Tabla 6**).

En el momento del cambio de terapia e inicio de INI, la mediana del recuento de células T CD4+ y de la CV de los pacientes con niveles de viremia detectables, fueron 194 células/ $\mu$ L y 3,7 log copias/mL. En 10 pacientes (38,5%) no se detectó ARN de VIH-2 y fue la baja recuperación de linfocitos T CD4+ la que llevó a un cambio de terapia por los médicos responsables.

Tras una mediana de tiempo de seguimiento de 13 meses, un 65,4% (17 sujetos) tenía niveles de ARN de VIH-2 indetectables: 8 la mantuvieron, 2 la perdieron (pacientes F1 y F6 de **Tabla 7**) y 9 la alcanzaron. Sin embargo, en 4 de estos 17 sujetos se produjeron recaídas tras conseguirse

un control virológico durante un intervalo de tiempo que osciló entre 11-34 meses. Globalmente, la mediana del incremento en el recuento de linfocitos T CD4+ fue +126 células/ $\mu$ L.

**Tabla 6.** Principales características clínicas de los pacientes VIH-2+ tratados con INI.

Características	Naïve	Experimentados
<b>Nº</b>	18	26
<b>Cifra de linfocitos T CD4+ basales, células/<math>\mu</math>L, mediana (RIC)</b>	264 (134-604)	194 (57-421)
<b>ARN de VIH-2 en plasma</b>		
Niveles indetectables, n (%)	8 (44,4)	10 (38,5)
CV en pacientes virémicos, n (%)	3,6 (2,6-4,2)	3,7 (2,7-4,4)
<b>Subtipo de VIH-2, n (%)</b>		
A	7	17
B	1	4
desconocido	10	5
<b>INI, n (%)</b>		
RAL	9 (50)	19 (73,1)
EVG	6 (33,3)	1 (3,8)
DTG	3 (16,7)	6 (23,1)
<b>IP, n (%)</b>		
DRV/r <sup>a</sup>	1 (5,6)	10 (38,5)
otros	0	3 <sup>b</sup> (11,5)
<b>ITIAN, n (%)</b>		
TAF + FTC	4 (22,2)	1 (3,8)
TDF + 3TC/FTC	11 (61,1)	17 (65,4)
ABC + 3TC	3 (16,7)	3 (11,5)
ninguno	0	5
<b>Pacientes con CV indetectable en algún momento durante el seguimiento, n (%)</b>	16 (88,9)	17 <sup>c</sup> (65,4)
<b>Tiempo con CV indetectable, meses, mediana (RIC)</b>	12 (6-29)	13 (0-27,5)
<b>Ganancia en número de linfocitos T CD4+, células/<math>\mu</math>L, mediana (RIC)</b>	82 (13-272)	126 (48-200)
<b>Fracaso al tratamiento con INI, n (%)</b>	2 (11,1)	13 (50)

a: dosis de 600 mg/100 mg 2 veces al día.

b: 1 LPV/ritonavir; 1 TPV/ritonavir; 1 SQV/ritonavir.

c: 4 individuos alcanzaron viremia indetectable después de empezar la terapia con INI, pero la CV rebrotó durante el seguimiento.

#### 4.2.5. Fracazos virológicos (FV) y mutaciones de resistencia a los inhibidores de la integrasa (INI)

En total, se reconocieron 15 individuos (34%) VIH-2+ que experimentaron FV con TARGA basado en INI. De estos, 2 (11,1%) eran del grupo tratado con INI como TARGA de 1ª línea y 13 (50%) pertenecían al grupo de rescates terapéuticos con INI tras FV previos. Como se ha descrito anteriormente, 4 sujetos, incluidos en el segundo grupo, consiguieron supresión virológica

durante algún tiempo. Por el contrario, en los 11 individuos restantes no se alcanzaron niveles indetectables en ningún momento. La media de tiempo transcurrido entre el inicio de la terapia basada en INI y el análisis del genotipo viral en el FV fue 42 semanas (rango 16–88).

De estos 15 individuos con fracaso terapéutico, 12 seleccionaron mutaciones asociadas a resistencia a los INI: N155H (5), Q148H/R (3), Y143C/G (3) y R263K (1). Todos, a excepción de 1, desarrollaron otros cambios compensatorios. En la **Tabla 7** aparecen detalladas las características principales los 15 pacientes que fracasaron, siendo N1 y N2 los pacientes que tomaron el INI como TARGA de 1ª línea y F1-F13 los pacientes que habían fracasado a terapias previas. El paciente N1, en cuyo primer aislado se identificó la selección del cambio N155H, mostró posteriormente variaciones en las posiciones Y143 y N155. Este hecho sugiere un posible cambio de vía de resistencia a RAL. En la **Figura 15** se muestra dicho evento.

Además, algunos pacientes desarrollaron mutaciones en el gen de la RT: en 7 se seleccionó la sustitución M184V, en 6 la K65R y en 1 la Q151M. En tres individuos se observaron combinaciones de estos cambios: uno albergaba K65R y Q151M, mientras que otros dos seleccionaron las mutaciones K65R y M184V. Por otro lado, el análisis del gen de la PR reveló la presencia de sustituciones en 10 pacientes: I50V (3), I54L/M (6), I82F/L (5), I84V (3), y L90M (3). En ocho de los individuos, estos cambios en la RT y en la PR reflejaban mutaciones persistentes tras FV anteriores con terapias basadas en IPs y que posiblemente comprometieron, desde un primer momento, la eficacia del régimen que incluía INI.

**Tabla 7.** Características principales de los pacientes infectados por VIH-2 que fracasaron al tratamiento basado en INI.

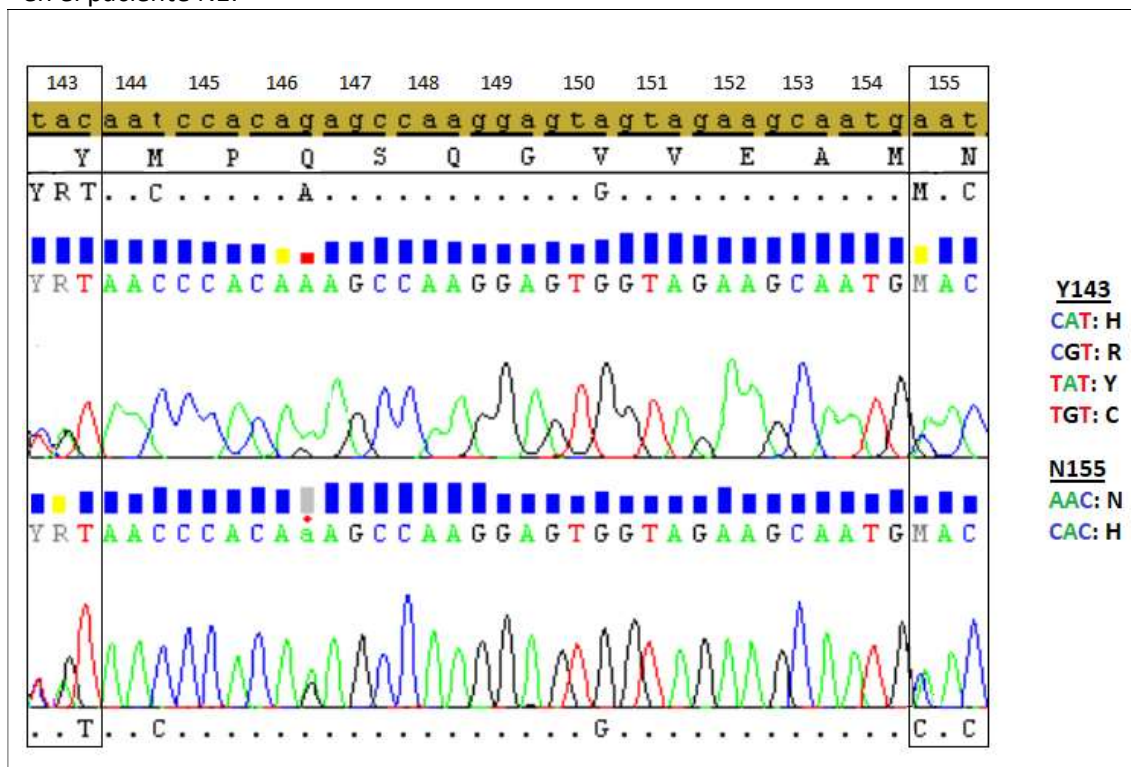
ID <sup>a</sup>	Género (Edad, años)	País de origen	Subtipo VIH-2	TARGA	CV Indetectable (meses)	Mutaciones de resistencia <sup>b</sup>		
						IN	PR	RT
<b>N1</b>	H (13)	Guinea Ecuatorial	B	ABC+3TC+RAL	No	N155H/E92Q	-	M184V
<b>N2</b>	H (40)	Guinea Bissau	A	TDF+FTC+DRV/r+RAL	No	N155H/E92Q/T97A	I54M/I82F/L90M	M184V
<b>F1</b>	H (63)	Guinea Bissau	-	TDF+FTC+DTG	No	-	-	-
<b>F2</b>	H (17)	Cabo Verde	A	ddl+MVC+DRV/r+RAL	No	N155H/A153G	<b>I54M/I82F/L90M</b>	<b>K65R/Q151M</b>
<b>F3</b>	H (51)	Mali	A	TDF+FTC+ATV/r+RAL	Sí (14)	N155H/A153G	I84V/L90M	-
<b>F4</b>	H (58)	España	B	TDF+TPV/r+RAL	No	N155H/A153G	<b>I54L/I82L</b>	<b>M184V</b>
<b>F5</b>	H (49)	Senegal	A	TDF+FTC+DRV/r+RAL	Sí (34)	-	-	<b>M184V</b>
<b>F6</b>	M (40)	Senegal	A	TDF+FTC+RAL	No	-	-	-
<b>F7</b>	H (40)	Guinea Bissau	A	TDF+DTG+DRV/r	No	Q148H/G140S	I50V	K65R
<b>F8</b>	M (38)	Portugal	A	TDF+FTC+RAL	Sí (11)	Q148R/G140A	<b>I82L/I84V</b>	-
<b>F9</b>	H (48)	Senegal	A	DRV/r+MVC+RAL	No	Q148R/G140S	I50V	<b>M184V</b>
<b>F10</b>	H (53)	Senegal	B	DRV/c+DTG	Sí (16)	R263K/E92G	<b>I50V/I54L</b>	<b>K65R</b>
<b>F11</b>	H (52)	España	B	TDF+DRV/r+RAL	No	Y143C	<b>I54M/I84V</b>	<b>K65R</b>
<b>F12</b>	H (47)	África	A	ZDV+3TC+RAL	No	Y143C/E92Q	<b>I54M/I82F</b>	<b>K65R/M184V</b>
<b>F13</b>	H (37)	Guinea Bissau	A	TDF+FTC+RAL	No	Y143G/T97A/A153S	-	K65R/M184V

H: hombre; M: mujer.

a: N, pacientes del grupo que tomaron INI como TARGA de primera línea; F, pacientes que habían tomado tratamientos previos al TARGA basado en INI.

b: las mutaciones preexistentes a la toma de INI aparecen en negrita

**Figura 15.** Selección concomitante de variantes asociadas a las vías de resistencia Y143 y N155 en el paciente N1.



A la derecha de la imagen se muestran los posibles cambios ocurridos en las posiciones Y143 y N155, como consecuencia de la mezcla de bases observadas.

#### 4.3. Mutaciones de resistencia a raltegravir y su impacto en la respuesta a dolutegravir en pacientes infectados por VIH-2

##### 4.3.1. Selección de pacientes y técnicas empleadas

Los sujetos analizados eran individuos seropositivos para VIH-2, cuya infección era monitorizada por especialistas del VIH que eran además miembros del grupo español de estudio de la infección por VIH-2. Los pacientes fueron divididos en dos grupos considerando si previamente habían recibido INIs o no. El primer grupo estaba formado por individuos VIH-2+ que no habían tomado con anterioridad ningún INI. El objetivo de la inclusión de estos pacientes fue el análisis de una posible presencia de variantes asociadas a resistencia a INI en el gen de la IN del VIH-2, bien presentes de forma natural o quizá adquirida como consecuencia de una transmisión. El segundo grupo lo formaban pacientes a los que se les había prescrito un régimen antirretroviral basado en RAL, con el que habían hecho un FV. Algunos de ellos fueron rescatados con otra terapia antirretroviral que incluía al INI de segunda generación, DTG.

Se realizó la cuantificación de la CV plasmática del VIH-2 y la amplificación (RT-PCR y PCR tipo nested) y secuenciación del gen de la IN, PR y RT.

#### 4.3.2. Características epidemiológicas y análisis del gen de la integrasa en pacientes naïve para los inhibidores de la integrasa (INI) y en pacientes tratados con raltegravir en fracaso virológico (FV)

De un total de 319 personas incluidas en la cohorte española de infección por VIH-2 hasta diciembre de 2015, se obtuvieron 53 secuencias de la IN del VIH-2 en 30 individuos. Estas 53 secuencias, pertenecían a 20 pacientes naïve para los INI y a 10 sujetos que habían fracasado a terapias antirretrovirales basadas en RAL. Sólo se incluyeron en este estudio sujetos de los que se tenía muestras de plasma y en los que había viremia detectable.

De forma global, 23 (76,7%) eran varones que habían adquirido la infección por VIH-2 principalmente por contacto heterosexual (73%). La mayoría procedía de países del África subsahariana (>70%), pero 5 (16,7%) eran españoles nativos. Las características principales de la población de estudio aparecen reflejadas en la **Tabla 8**.

En el análisis de las secuencias de la IN en los 20 individuos naïve para RAL, sólo se identificó una mutación secundaria (S138A) en un paciente. No hay información acerca del impacto de este cambio en aislados basales sobre la respuesta virológica a RAL. Este paciente inició un régimen basado en RAL y alcanzó la supresión virológica durante más de 2 años.

De los 10 pacientes que fracasaron a regímenes que incluían RAL, se analizaron un total de 33 secuencias en diferentes momentos. La mediana del tiempo de administración de la terapia que contenía RAL fue 13 meses (RIC 9-19,5). Las características principales de estos pacientes aparecen en la **Tabla 9**. En el momento del FV, la mediana de los niveles de ARN de VIH-2 eran 2,9 log copias/mL (RIC 2,3–3,5). A excepción de un individuo, todos los pacientes desarrollaron mutaciones asociadas a resistencia. Los patrones de resistencia observados fueron los siguientes: N155H+A153G/S (4 pacientes); Q148R+G140A/S (2) y Y143G/C+A153S (3). Cabe destacar que, todos los pacientes con las mutaciones Y143C/G y N155H desarrollaron los cambios A153S/G. En la **Tabla 10** se describen todas las sustituciones asociadas a resistencia en el gen de la IN encontradas en los aislados de los 9 pacientes analizados. Además, todos ellos mostraron distintas mutaciones de resistencia en los genes de la RT y la PR.

**Tabla 8.** Principales características de la población de estudio.

	Naïve para RAL	Experiencia previa con RAL	Total
<b>Número de individuos</b>	20	10	30
<b>Hombres, n (%)</b>	15 (75)	8 (80)	23 (76,7)
<b>Mediana de la edad (años), (RIC)</b>	48 (39-54)	50 (39-55)	48 (40-54)
<b>Origen, n (%)</b>			
África <sup>a</sup>	14 (70)	7 (70)	21 (70)
España	4 (20)	2 (22)	6 (20)
Portugal	1(5)	1 (11)	2 (6,7)
Otros	1 (5)	-	1 (3,3)
<b>Cifra de linfocitos T CD4+ (células/<math>\mu</math>L), mediana (RIC)</b>	276 (60-371)	176 (40-249)	210 (52-350)
<b>ARN de VIH-2 (log copias/mL), mediana (RIC)</b>	3,2 (2,2-3,8)	2,9 (2,3-3,5)	3,1 (2,3-3,8)
<b>Subtipo VIH-2, n</b>			
A	15	7	22
B	4	2	6
desconocido	1	1	2

a: Países africanos (número absoluto): Guinea Bissau (8), Senegal (6), Cabo Verde (2), Mali (1), Gambia (1), Costa de Marfil (1), Mauritania (1) y desconocido (1).



**Tabla 9.** Características principales de los pacientes que fracasaron a RAL.

Paciente	Género	Edad (años)	País de origen	Año de diagnóstico	TARGA con RAL	ARN de VIH-2 basal (log copias/mL)	Nº de linfocitos T CD4+ (células/ $\mu$ L)	Meses con RAL
1	H	42	Guinea Bissau	1991	TDF+FTC	NR	NR	13
2	H	52	África	1998	ZDV+3TC	5,05	128	11
3	H	55	España	2011	DRV/r+TDF	4,06	114	6
4	M	44	Portugal	2007	TDF+FTC	2,46	371	11
5	H	53	Senegal	2008	DRV/r+MVC	3,84	60	36
6	H	28	Cabo Verde	1990	DRV/r+MVC	3,15	24	20
7	H	64	España	2009	ZDV+3TC+ATV/r	4,42	240	17
8	H	48	Guinea Bissau	2006	TDF+FTC+DRV/r	NR	NR	7
9	H	57	Mali	1996	TDF+3TC+ATV/r	50	109	19
10	M	31	Guinea Bissau	1985	TDF+MVC+DRV/r	50	308	36

H: hombre; M: mujer; NR: no realizado.

**Tabla 10.** Patrones de resistencia en la región de la IN en pacientes infectados por VIH-2 que fracasan a RAL.

Paciente	Subtipo de VIH-2	ARN de VIH-2 (log copias/mL)	Vía de resistencia	Mutaciones asociadas a resistencia						
				I84	Q91	E92	T97	A119	G140	A153
1	A	2,9	Y143G		R		A	T		S
2 <sup>a</sup>	A	3,8	Y143C/G		Q/R	Q/E	T/A	T		S
3	B	4,4	Y143C		R					S
4	A	2,3	Q148R						A	
5	A	2,4	Q148R						S	
6	A	2,9	N155H	V						G
7	B	3,2	N155H	V						G
8	A	3,2	N155H	V		Q	A			S
9	A	2,3	N155H							G

a: el gen de la IN del paciente 2 evolucionó tras la presión continua de RAL. Se indican las variantes que se encontraron en todas las secuencias analizadas.

#### 4.3.3. Evolución del gen de la integrasa tras fracaso virológico (FV) a raltegravir

En los pacientes 2,6 y 8 se pudo analizar más de una secuencia tras la primera detección de una variante asociada a resistencia a RAL.

El paciente 2 seleccionó, a los 11 meses tras el inicio de RAL, los cambios Y143C+E92Q+A119T. Después, 21 meses más tarde se observó una evolución del patrón de resistencias observándose los cambios Y143G+Q91R+T97A+A119T. En la siguiente secuenciación, a los 9 meses, se observó que a este perfil de resistencia se había añadido el cambio A153S. En el paciente 6, se pudo demostrar el perfil I84V+A153G+N155H en las dos ocasiones en las que se amplificó la secuencia de la IN, a los meses 20 desde el inicio de RAL. Seis meses tras su retirada, se pudo apreciar la reversión de N155H, aunque I84V y la mezcla A153A/G aún permanecían 8 meses más tarde. Dos años y dos meses después, RAL fue reintroducido en el TARGA prescrito y, aunque no se seleccionó ningún cambio principal, sí se demostró la persistencia de A153A/G e I84V a los 17 meses tras su introducción. En el caso del paciente 8, en el que se seleccionaron los cambios I84V+E92Q+T97A+A153S+N155H, este mismo perfil se mantuvo desde su selección en el mes 7 posterior al inicio de RAL, hasta el mes 17, en el que se le retiró RAL.

#### 4.3.4. Respuesta al tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) basado en dolutegravir en pacientes cuyos virus habían seleccionado previamente mutaciones asociadas a resistencia a raltegravir

Tras el FV a RAL, 5 sujetos (pacientes 2, 3, 6, 7 y 8) fueron tratados con DTG y un régimen acompañante con al menos otros 2 inhibidores. En las combinaciones de los 5 pacientes se

incluyó 1 IP, que fue DRV/r (4 pacientes) o ATV/r (1), junto con dos ITIAN. A partir de los 6 meses, todos, excepto el paciente 3, alcanzaron reducciones significativas en la CV del VIH-2 (>0,5 log y/o niveles indetectables). Además, estas reducciones se acompañaron de un incremento en la mediana de linfocitos T CD4+ de 114 células/ $\mu$ L (RIC 76–156). Después de una mediana de 14 meses (rango 6–34) con DTG, 3 pacientes experimentaron un rebote en la CV. En ése momento, el análisis de la IN reveló una selección de mutaciones nuevas en todos los casos (pacientes 6, 7 y 8). El cambio N155H, previamente seleccionado en los 3 pacientes durante el FV a RAL no se seleccionó en ninguno. En dos de ellos emergieron los cambios Q148K y Q148R, mientras que en el tercer sujeto se seleccionó la sustitución G118R. Además de estos cambios aparecieron otros reemplazos que se muestran en la **Tabla 11**. El tiempo que transcurrió desde que RAL fue retirado de las combinaciones hasta el inicio de DTG, en estos tres pacientes fue: 0 meses para el paciente 6, ya que pasó de tomar RAL a tomar DTG, 22 meses para el paciente 7 y 31 meses en el caso del paciente 8. En el momento de inicio de DTG, sólo se pudo confirmar la ausencia de una mutación principal asociada a resistencia a los INI en el paciente 6.

**Tabla 11.** Evolución de la secuencia del gen de la IN en los tres pacientes infectados por VIH-2 que fracasaron a DTG tras un fracaso previo a RAL.

	Paciente 6	Paciente 7	Paciente 8
<b>Variantes asociadas a resistencia a RAL</b>	I84V/A153G/ <b>N155H</b>	I84V/A153G/ <b>N155H</b>	I84V/E92Q/T97A/ A153S/ <b>N155H</b>
<b>Variantes asociadas a resistencia a DTG</b>	K4R/K14R/V75A/ <b>G118R</b> / A119T/V151I/L220F	V141I/ <b>Q148K</b> / V150T/A153S/Q208H	<b>Q148R</b>

En negrita aparecen las mutaciones principales asociadas a resistencia a DTG.

#### 4.3.5. Evolución del gen de la integrasa tras fracaso virológico (FV) a dolutegravir

En los pacientes 3 y 6 se pudo obtener más de una secuencia tras la detección del FV a DTG. El seguimiento clínico de respuesta a DTG en el caso del paciente 3 fue prolongado, pudiendo secuenciarse el gen de la IN hasta en 4 momentos diferentes tras su inicio: a los 6, 12, 13, y 17 meses. En todos los genotipos secuenciados, sólo se detectó la presencia de la mutación Q91R. No se observó ninguna mutación principal ni tampoco otras secundarias. En el paciente 6, el genotipo basal previo a la administración de DTG incluía los cambios I84V y A153G. Seis meses tras el inicio de DTG se observó la selección del cambio G118R, mientras que, pasados 20 meses desde entonces, se detectó la presencia de las sustituciones asociadas a resistencia secundaria A119T y V151I, junto con los otros cambios detallados en la **Tabla 11**. En la **Figura 16** aparece reflejada la evolución virológica e inmunológica de los cinco pacientes que fueron rescatados

con DTG, desde el inicio de la administración de RAL. Además, aparecen los fármacos activos en cada momento y la evolución de los patrones de resistencia en la IN.

**Figura 16.** Evolución de los pacientes que fueron rescatados con un TARGA basado en DTG tras fracaso previo a RAL.



Eje X: tiempo en meses desde el inicio de la toma de RAL. Eje Y de la izquierda (y líneas naranjas): cifra de CD4, expresados en nº linfocitos/ $\mu$ L. Eje Y de la derecha (y líneas azules): niveles plasmáticos de ARN de VIH-2, expresados en log copias/mL. Los fármacos a los que el virus es resistente se indican en rojo, cuando hay una resistencia intermedia aparecen en verde y si son susceptibles en negro.

## DISCUSIÓN

---

### 5.1. Respuesta al tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) de los pacientes coinfectados por VIH-1 y VIH-2 que residen en España

Dado que la infección por VIH no genera una inmunidad protectora, la superinfección por VIH-1 en personas portadoras del VIH-2, o viceversa, podría darse en lugares donde ambos virus están presentes ([Rayfield et al., 1988](#); [Jallow et al., 2009](#); [Borget et al., 2008](#); [Harries et al., 2010](#)). En España, el primer caso confirmado de infección dual por VIH-1 y VIH-2 se describió en el año 1993 ([Soriano et al., 1993](#)). Hasta diciembre de 2018, se han descrito un total de 34 casos de coinfección (9,1%), en los 373 sujetos con infección confirmada por VIH-2 en España.

La sospecha clínica de la coinfección por VIH-1 y VIH-2 debe considerarse, especialmente, en nativos seropositivos para VIH del occidente de África. También debe ser perseguida en personas que hayan viajado o vivido en áreas endémicas para la infección por VIH-2 y que admitan haber tenido conductas de riesgo para su adquisición. Un tercer grupo en el que también debería descartarse, serían las personas que hayan tenido relaciones sexuales con personas nativas del occidente de África. La confirmación de la presencia de ambos virus es imprescindible en casos de doble reactividad serológica, debido a las consideraciones especiales en la terapia antirretroviral que debe ser administrada en esta población de pacientes ([Rodés et al., 2005](#); [Sarfo et al., 2009](#); [Landman et al., 2009](#)). La amplificación de ARN o de ADN proviral, de ambos virus, constituye la mayor evidencia de infección dual, aunque también pueden ser útiles las pruebas serológicas discriminatorias ([Lindman et al., 2019](#); [Centers for Disease Control and Prevention and Association of Public Health Laboratories, 2014](#)).

El tratamiento antirretroviral prescrito en las personas coinfectadas debe incluir inhibidores activos frente al VIH-2. En este sentido, todos los INI, la mayoría de los ITIAN y algunos IPs, como DRV, LPV y SQV, son eficaces en la supresión del VIH-2 ([Menéndez-Arias and Álvarez, 2014](#)). Aun teniendo en cuenta estas consideraciones, hay algunos aspectos del tratamiento antirretroviral en la infección por VIH-2 que difieren con respecto a la respuesta en el VIH-1. Entre estos están la frecuente selección de variantes asociadas a resistencia en el VIH-2 y una recuperación inmunológica más lenta ([Ekouevi et al., 2014](#)).

De acuerdo con algunos estudios previos realizados en países del occidente de África ([Harries et al., 2010](#); [Sarfo et al., 2009](#); [Ekouevi et al., 2013](#)), los pacientes coinfectados en España eran más jóvenes y tenían menores cifras de linfocitos T-CD4+ que las personas con mono infección por VIH-2. Este hecho apoya un inicio rápido de la terapia antiretroviral. Además, teniendo en

cuenta estas características, sería recomendable un inicio temprano de la terapia antirretroviral y la inclusión exclusiva de fármacos que supriman de forma eficaz al virus para evitar o minimizar el riesgo de escape viral ([Rodés et al., 2005](#); [Sarfo et al., 2009](#)). Por otro lado, la monitorización de la CV debe realizarse de forma rutinaria tanto para el VIH-1 como para el VIH-2 en los pacientes que estén bajo terapia antirretroviral.

En esta cohorte, hasta el 80% de los pacientes coinfectados tratados lograron la supresión virológica para el VIH-2, un porcentaje similar al observado en el VIH-1 (86,7%). Tres de los 4 pacientes que hicieron un FV estaban tomando regímenes antirretrovirales optimizados para el VIH-2. Dos de ellos tomaban una terapia que incluía dos ITIAN y un IP, mientras que, el tercer sujeto, pese a recibir ITIAN, IPs y RAL, no logró alcanzar cifras superiores a los 100 linfocitos T-CD4+/ $\mu$ L. El otro FV de VIH-2, ocurrió en el año 2007 y se observó en un sujeto tratado con 2 ITIAN y fosamprenavir (FPV). Este paciente no logró suprimir ninguno de los dos virus.

En conjunto, la proporción de sujetos que consiguieron suprimir los dos virus en esta cohorte fue superior a la descrita en otros estudios, en los que algunos individuos recibieron ITIAN ([Borget et al., 2008](#); [Sarfo et al., 2009](#)). Además, la ganancia de linfocitos T-CD4+ en estos pacientes fue también satisfactoria, con una mediana de 212 células/ $\mu$ L. En línea con estos datos, debe destacarse también que la mayoría de los pacientes incluidos en este estudio recibieron IPs activos e INI, cuya actividad antiviral ha sido documentada en la infección por VIH-2 ([Menéndez-Arias and Álvarez, 2014](#); [Ekouevi et al., 2014](#)). De hecho, este estudio podría ser el primero en describir la eficacia de los INI en una serie pequeña de 6 pacientes coinfectados. En el año 2009, un estudio ya describió una respuesta eficaz en un paciente coinfectado al que se trató con una terapia antirretroviral que incluyó RAL y dos ITIAN ([Landman et al., 2009](#)).

El reconocimiento de los subtipos de VIH-1, CRF02\_AG, como el más frecuente en esta población coinfectada, podría sugerir que la mayoría de las coinfecciones han ocurrido en África y no en España, como superinfecciones por VIH-1 en sujetos previamente infectados por VIH-2 ([Gottlieb et al., 2003](#); [de Mendoza et al., 2017](#)). Sin embargo, la transmisión local también podría haber ocurrido, ya que recientemente, se confirmó la circulación de subtipos no B de VIH-1 en los africanos que residen en España ([Pérez-Parra et al., 2017](#)). Al menos, se pudo confirmar el caso de una mujer VIH-2+ que trabajaba en la prostitución y adquirió posteriormente el VIH-1. Este caso subraya la necesidad de repetir las pruebas serológicas y excluir la infección por VIH-1 de forma periódica en los sujetos VIH-2+ que continúan teniendo comportamientos sexuales de riesgo.

Así, se ha descrito un 9% de infecciones duales por VIH-1 y VIH-2, entre los portadores del VIH-2 residentes en España. El continuo flujo de inmigración a partir de los países del occidente de África parece respaldar este relativamente alto porcentaje de coinfectados. La caracterización correcta de todos los individuos seroreactivos para VIH es imprescindible para asegurar un manejo terapéutico y clínico óptimos en esta población especial. Los regímenes que contienen INI o IPs activos suprimen, de forma eficaz, la replicación de ambos virus, VIH-1 y VIH-2.

## **5.2. Experiencia clínica con los inhibidores de la integrasa (INI) en sujetos infectados por VIH-2 que residen en España**

El tratamiento de la infección por VIH-2 sigue las mismas reglas, en general, que el VIH-1, salvo por algunas consideraciones especiales (Saag et al., 2018; Gottlieb G, 2018). Hasta la fecha, no existe ningún ensayo clínico aleatorizado que determine el momento de inicio del TARGA en esta población. De hecho, hay opiniones muy diversas y a día de hoy no hay una estrategia terapéutica y óptima clara (Ekouevi et al., 2014). Las guías actuales para el tratamiento de los pacientes VIH-2+ se basan en estudios de cohortes retrospectivas, en series pequeñas de casos, en informes de casos individuales, datos in vitro y en la extrapolación de los estudios llevados a cabo en pacientes portadores de VIH-1 (Gilleece et al., 2010; Gottlieb G, 2018).

Todos los INI aprobados hasta la fecha para el VIH-1 exhiben una actividad potente frente al VIH-2 (Roquebert et al., 2008b; Smith et al., 2015; Tsiang et al., 2016). Además, se han publicado recientemente los datos de dos ensayos clínicos llevados a cabo en Francia y Senegal, respectivamente, en los que se evaluó la eficacia y seguridad del TARGA que incluía RAL o EVG como opción de primera línea de tratamiento. El primer estudio, liderado por Matheron et al. (Matheron et al., 2018), evaluó la combinación de RAL+FTC+TDF en 30 sujetos infectados por VIH-2. En términos de respuesta virológica, 27 de 28 pacientes que completaron las 48 semanas de seguimiento alcanzaron la indetectabilidad (<40 copias/mL) y exhibieron una ganancia de 87 linfocitos T CD4+/μL. Sin embargo, de acuerdo con el objetivo primario del estudio, basado en un aumento superior a 100 células/μL con respecto a la cifra basal, únicamente el 40% de los participantes habría mostrado una respuesta exitosa. En el segundo ensayo, llevado a cabo por el grupo de estudio de VIH-2 de la Universidad de Washington y Dakar (Ba et al., 2018), se incluyeron 30 individuos VIH-2+, que iniciaron tratamiento antirretroviral con EVG/c+FTC+TDF. Globalmente, un 93,3% de los individuos mostró niveles indetectables de ARN de VIH-2 en la semana 48. El incremento en la mediana de linfocitos T CD4+ en este estudio fue +161 células/μL. En general, nuestros resultados en individuos naïve están en línea con los resultados observados en estos dos ensayos. La mayoría de nuestros pacientes (16 de 18; 88,9%), logró la



supresión viral, con una mediana en la ganancia de CD4+ de +81 células/ $\mu$ L, tras un año de TARGA.

En conjunto, las respuestas al tratamiento de la infección por VIH-2 difieren de las observadas en el VIH-1. Para empezar, una subpoblación de pacientes en los tres estudios (casi la mitad en el nuestro) tenían niveles indetectables de ARN de VIH-2 de forma basal, lo cual casi nunca ocurre en la infección por VIH-1. En segundo lugar, la ganancia en el recuento de los linfocitos T CD4+ fue bastante modesta en comparación con lo que se observa generalmente en los pacientes VIH-1+. Por último, un 80% de los individuos VIH-2+ que hicieron FV seleccionaron mutaciones de resistencia, pese a sus niveles bajos de replicación. Esto sustentaría la ya conocida menor barrera genética al desarrollo de resistencias en VIH-2 en comparación con lo observado en el VIH-1 para los antirretrovirales actualmente disponibles.

El uso de los INI como parte de intervenciones de rescate para los individuos VIH-2+ que experimentaron fracasos terapéuticos previos ya se ha examinado con anterioridad ([Charpentier et al., 2010](#); [Smith et al., 2012](#); [Descamps et al., 2015](#)), incluyendo algunos estudios de nuestro grupo ([Treviño et al., 2015](#); [Requena et al., 2017](#)). En general, los beneficios del TARGA se observan tanto en la recuperación inmunológica como en la supresión viral, como se ha podido observar en este estudio. Sin embargo, de los 26 pacientes pretratados que iniciaron TARGA basado en INI, solo la mitad logró alcanzar viremia indetectable al final del seguimiento. Con respecto a la otra mitad, 4 individuos consiguieron un control virológico, pero finalmente, se produjo un rebrote viral. Los otros 9 sujetos no consiguieron el control virológico con un régimen basado en INI. Además, a excepción de 3 casos, en todos los pacientes el virus seleccionó mutaciones asociadas a resistencia a los INI.

Con respecto a los patrones de resistencia en el gen de la IN en los pacientes que fracasaron a los INI, se observaron las siguientes mutaciones en 12 pacientes: N155H (5), Q148H/R (3), Y143C/G (3) Y R263K (1). Además, esta es la primera vez que se describe la selección de mutaciones principales asociadas a resistencia tras FV a DTG (Q148H y R263K) en VIH-2. De los 12 pacientes que seleccionaron cambios, todos, a excepción de uno, desarrollaron otras mutaciones compensatorias a los INI, incluyendo E92Q (4), T97A (2), G140A/S (3) y A153G/S (4). Recientemente, en un estudio en el que se analizaron las variantes resistentes minoritarias se documentó la presencia de T97A en un sujeto naïve VIH-2+ ([Storto et al., 2018](#)). Por sí sola, esta mutación parece no conducir a niveles de resistencia a los INI, pero podría reducir la susceptibilidad si emerge junto con otros cambios.

Hasta donde se sabe, esta es la primera vez que se documenta la presencia de la mutación R263K junto con E92G como un potencial mecanismo de pérdida de susceptibilidad a DTG en VIH-2. El virus que desarrolló este cambio fue un subtipo B. Este cambio fue identificado por primera vez como vía de resistencia a DTG en estudios de selección in vitro en VIH-1 ([Quashie et al., 2012](#)). La exitosa experiencia inicial de DTG en pacientes que lo tomaban como parte de un régimen de primera línea alentó durante un tiempo sobre la posibilidad de que no se seleccionasen mutaciones asociadas a resistencia a DTG tras FV in vivo. La alta barrera genética y su elevado tiempo de disociación de la IN podrían explicar este éxito. Sin embargo, tiempo después, se describió la aparición de Q148K y R263K en los aislados de dos pacientes infectados por VIH-1 que fracasaron a la terapia de primera línea que incluía DTG ([Fulcher et al., 2018](#); [Pena et al., 2018](#)). Además, la emergencia de la mutación R263K ha sido documentada, con mayor frecuencia, en individuos que fracasaron a terapias previas y en los que se administró DTG como primer INI ([Mesplède et al., 2017](#)). En el estudio presentado en esta tesis, el paciente VIH-2+ en cuyo aislado se observó este cambio venía precisamente de este mismo escenario, ya que había tomado otras combinaciones antirretrovirales con anterioridad, pero era naïve para los otros INI, por lo que quizá la selección de la mutación R263K en el VIH-2 siga las mismas pautas que en el VIH-1. En el momento de su selección, este paciente estaba en monoterapia encubierta, puesto que era resistente a DRV desde antes del inicio de DTG y era el único fármaco acompañante. Sin embargo, previamente, este paciente logró alcanzar la supresión virológica durante 16 meses, hecho que subraya la potente actividad de DTG en pacientes VIH-2+.

Los estudios in vitro que se han realizado usando mutantes R263K mostraron que esta mutación confería unos niveles moderados en la resistencia fenotípica a los INI y además conducía a una menor capacidad de replicación viral ([Mesplède et al., 2013](#)). Además, hasta la fecha, no se ha identificado una mutación compensatoria. Por otro lado, la sustitución E92G ha sido descrita como un polimorfismo raro seleccionado en pacientes que han recibido RAL y EVG. Hipotéticamente, este cambio, junto con R263K, podría explicar el FV a DTG de este paciente VIH-2+, aunque en VIH-1 E92G no parece, por sí sola, tener efecto sobre la pérdida de susceptibilidad a DTG ([Base de datos de resistencias de VIH-1 de la Universidad de Stanford](#)).

La emergencia del patrón Q148H+G140S también constituye otro primer caso de selección asociada a resistencia a DTG en VIH-2. Hasta el año 2018, esta combinación no había sido descrita en pacientes VIH-2+ que fracasaban a RAL. Estudios in vitro mostraron que los mutantes individuales G140S y Q148H no tenían un efecto significativo sobre la reducción en la susceptibilidad a DTG, mientras que la variante Q148R+G140S fue una de las que más resistencia exhibía a DTG en el aislado de referencia ROD, de VIH-2, multiplicando hasta 21 veces la IC<sub>50</sub> al

fármaco (por sus siglas en inglés de la concentración inhibitoria de fármaco necesaria para suprimir el 50% de la replicación) (Smith et al., 2015). Curiosamente, en un estudio reciente, Hingrat y colaboradores describieron por primera vez la presencia de G140S+Q148H en un paciente VIH-2+. En un estudio de susceptibilidad fenotípica realizado en esta y otros patrones asociados a resistencia a RAL, se observó un aumento de más de 300 veces la IC<sub>50</sub> para RAL, DTG, CAB y EVG (Hingrat et al., 2018).

Con respecto al paciente N1, la existencia de cambios en las posiciones N155 y Y143 podría indicar, en poblaciones minoritarias, la coexistencia de ambas vías principales en un mismo genotipo. Sin embargo, previamente se ha demostrado mediante experimentos in vitro, que N155H y Y143C generan una mala conformación, lo que lleva a pensar en la difícil selección de ambos cambios en un mismo genotipo por selección natural (Ni et al., 2011). En un estudio que analizó la evolución en el gen de la IN, tras presión farmacológica con RAL, la sustitución N155H inicial fue sustituida por Y143C en un paciente. En esta ocasión, mediante un análisis de secuenciación poblacional y clonal, se corroboró la ausencia de clones portadores de N155H y Y143C (Xu et al., 2009). Sería más probable, por tanto, que la población viral mayoritaria del paciente N1 estuviese haciendo un cambio de patrón de N155H a Y143C, como se ha visto en el VIH-1 tras una exposición continua a RAL (Fransen et al., 2012).

Por último, un estudio reciente ha descrito un nuevo patrón de resistencia en los pacientes VIH-2+ que fracasaron a RAL (Hingrat et al., 2018). Este consiste en la inserción de 5 aminoácidos después del codón R231 del gen de la IN, en la región C-terminal. Los nuevos aminoácidos son una duplicación de los 5 aminoácidos anteriores (codones 227, 228, 229, 230 y 231). La mayoría de pacientes en los que se ha descrito este cambio era portadora del subtipo B (5/6). En los pacientes incluidos en este estudio tratados con RAL y con FV no se seleccionó esta inserción. Sin embargo, sí se observó en un paciente que fue rescatado con DTG tras un FV previo con un régimen que incluía RAL. Cabe destacar que este patrón de resistencia fue previamente descrito (Andrews et al., 2016), en modelos animales a los que se trató con inyecciones de cabotegravir. Este estudio mostró altos niveles de resistencia a RAL, EVG, DTG y CAB. Por su lado, el estudio del grupo francés de 2018 también documentó un incremento en la IC<sub>50</sub> para RAL, EVG, DTG, CAB en los 4 aislados analizados. Además, en dos de ellos también se observó una pérdida significativa de susceptibilidad a BIC, el último INI aprobado. Este nuevo mecanismo de resistencia debe ser descartado en pacientes VIH-2+, adherentes al TARGA basado en INI y en los que no se detecte ninguna de las principales vías de resistencia identificadas en VIH-2: G118R, Y143C/G, Q148H/R, N155H o R263K.

Este estudio presenta algunas limitaciones. Entre ellas, la adherencia de los pacientes al tratamiento antirretroviral es un aspecto importante que no se ha podido considerar. Sólo en un subgrupo de pacientes esta información era fiable. En el caso de los pacientes españoles que fracasaron al TARGA, sí se pudo confirmar una mala adherencia. Por el contrario, en los pacientes africanos, la barrera idiomática y la asistencia de forma irregular a sus citas médicas, dificultaron su estimación. Otro factor que tampoco se consideró en este estudio fue la coinfección de algunos individuos por VIH-1. Sin embargo, en todos ellos se obtuvieron CV indetectables de VIH-2 al final del seguimiento. Por otro lado, para este estudio se empleó la secuenciación poblacional o Sanger, en lugar de la secuenciación profunda. Quizá con este nuevo método se habrían podido detectar variantes de resistencia a los INI presentes de forma minoritaria en los 3 pacientes que fracasaron y en los que no se detectaron sustituciones asociadas a resistencia. Finalmente, es posible que el paciente que fracasó con DTG y cuyo aislado no albergaba mutaciones asociadas de resistencia en el gen de la IN, pudiese haberlas desarrollado en la región del tracto de polipurinas en el extremo 3' de *nef*, en línea con lo observado en un estudio reciente ([Malet et al., 2017](#)).

Este estudio resalta varios aspectos del TARGA en VIH-2. Primero, el tratamiento con INI parece ser seguro y eficaz en los pacientes infectados por VIH-2, particularmente en el grupo naïve. En este sentido, los datos observados procedentes de pacientes VIH-2+ confirmaron los resultados obtenidos en ensayos clínicos. Por otro lado, el número de pacientes VIH-2+ que desarrollan mutaciones de resistencia a los INI tras un FV fue mayor a lo observado en VIH-1, lo que indicaría una menor barrera genética del VIH-2 a los INIs. Por último, dado que los perfiles de resistencia a INI conllevan a menudo a una selección de varios cambios en el gen de la IN, existe una incertidumbre sobre la posibilidad de resistencia cruzada a los otros INI, incluso para los más recientes, como son BIC y CAB.

Dado que la infección por VIH-2 debe seguir las mismas indicaciones que la infección por VIH-1, se recomiendan un diagnóstico e inicio de TARGA de forma precoz. Sin embargo, dadas las limitadas opciones terapéuticas para esta infección, se debe tener en cuenta que es necesario realizar un seguimiento a corto plazo de los pacientes, considerando la dificultad en la elección de futuras terapias de rescate.

### 5.3. Mutaciones de resistencia a raltegravir y su impacto en la respuesta a dolutegravir en pacientes infectados por VIH-2

Tres fármacos pertenecientes a la familia de los INI estaban actualmente aprobados en el año 2017. Pese a un 40% de diferencia en la secuencia de aminoácidos entre las enzimas de la IN del VIH-1 y del VIH-2, datos in vitro y alguna experiencia clínica sugieren que RAL, EVG y DTG son eficaces frente a el VIH-2 ([Charpentier et al., 2010](#); [Roquebert et al., 2008b](#); [Treviño et al., 2015](#); [Menéndez-Arias and Álvarez, 2014](#)). El mecanismo de acción de los INI se basa en el bloqueo de la actividad de transferencia de las cadenas de ADN del virus, impidiendo así la incorporación del ADN proviral en el genoma humano de forma irreversible. El proceso de integración no tiene un homólogo en el ser humano, por lo que su inhibición representa una diana específica y eficaz frente al VIH. Además, los fármacos incluidos en esta clase presentan una toxicidad mínima y un excelente grado de tolerancia ([De Clercq and Li, 2016](#)).

Distintos ensayos clínicos llevados a cabo en individuos infectados por VIH-1 demostraron la eficacia y la seguridad de RAL ([Lennox et al., 2009](#); [Rockstroh et al., 2011](#)), EVG ([Sax et al., 2012](#)) y DTG ([Dow and Bartlett, 2014](#)), tanto en pacientes pretratados como en pacientes naïve.

En los estudios VIKING, la actividad de DTG fue evaluada en pacientes VIH-1+ que albergaban variantes con resistencia genotípica a RAL ([Eron et al., 2013](#)). Curiosamente, DTG demostró eficacia en este subgrupo de pacientes, exceptuando aquéllos que albergaban variantes en el codón Q148 junto con otras dos mutaciones adicionales basales ([Castagna et al., 2014](#)).

Todos los INI aprobados hasta la fecha exhiben una potente actividad frente al VIH-2 ([Charpentier et al., 2010](#); [Roquebert et al., 2008b](#); [Smith et al., 2012](#)). Sin embargo, hasta ahora no se había completado ningún ensayo aleatorizado con el que poder establecer cuestiones sobre cuándo iniciar el TARGA o la elección de terapias de primera o segunda línea en la infección por VIH-2 ([Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents](#)). Así, la estrategia óptima del tratamiento en la infección por VIH-2 no ha sido definida. Además, el FV y las mutaciones asociadas a resistencia a los ITIAN, IPs o INIs parecen seleccionarse más frecuentemente en pacientes VIH-2 durante la terapia ([Treviño et al., 2011](#); [Charpentier et al., 2015](#); [Raugi et al., 2013b](#)).

En esta cohorte se examinaron los perfiles de resistencia a los INI en un número relativamente alto de individuos naïve para los INI, así como en pacientes tratados con RAL y en aquéllos que fueron rescatados posteriormente con DTG. Al contrario que lo observado para los ITIAN, el VIH-2 no exhibe mutaciones de resistencia de forma basal a los INI en pacientes naïve para esta

clase de fármacos ([Cavaco-Silva et al., 2014](#)). En nuestro estudio, de 20 pacientes solo en uno se observó el polimorfismo E138A. El cambio en esta posición E138K/A ha sido previamente descrito como una mutación accesoria no polimórfica de resistencia seleccionada en pacientes VIH-1+ tratados con RAL, EVG o DTG ([Cavaco-Silva et al., 2014](#)). Este cambio es generalmente seleccionado en combinación con las mutaciones en el codón Q148 en la IN del VIH-1. Por sí solo, no reduce la susceptibilidad a los INI ([Jones et al., 2009](#)). Sin embargo, se asocia con una reducción en la susceptibilidad a RAL y EVG de 100 veces y de hasta 10 para DTG cuando acompaña a la mutación en el codón Q148 ([Eron et al., 2013](#)). En este paciente, la presencia del aislado E138A no se asoció con fracaso a RAL y esto apoyaba su reducido impacto en la respuesta a RAL.

Diez pacientes con VIH-2 experimentaron rebrote viral mientras estaban siguiendo un tratamiento basado en RAL. Todos, a excepción de uno, desarrollaron algunas de las mutaciones asociadas a la resistencia en el gen de la IN observadas en el VIH-1. El patrón más frecuente fue N155H (cuatro casos), seguido por Y143G/C (tres casos) y por Q148R (dos casos). De forma similar, encontramos otros cambios en la IN previamente observados específicamente en la infección por VIH-2 (Q91R y I84V), así como otros en posiciones asociadas a resistencia en ambos tipos de VIH (E92Q, T97A, G140A/S y A153G) ([Bercoff et al., 2010](#); [Treviño et al., 2015](#); [Salgado et al., 2009](#); [Xu et al., 2009](#)). Aunque solo dos pacientes en esta serie estaban infectados por el subtipo B, no pudimos establecer ninguna evidencia de una asociación entre el subtipo de VIH-2 y un patrón de resistencia específico frente a los INI. Por ejemplo, en uno de ellos se observaron los cambios Y143C+Q91R+A153S y en el otro N155H+I84V+A153G.

En 7 de los pacientes que fracasaron a RAL se observaron los cambios A153S/G. En la infección por VIH-1, la mutación S153F/Y es un polimorfismo muy infrecuente que se ha seleccionado in vitro con EVG, DTG y BIC. Por otro lado, S153Y/F ha mostrado reducir la susceptibilidad a BIC, DTG y EVG de dos a tres veces ([Margot et al., 2012](#); [Kobayashi et al., 2011](#)).

Estudios in vitro han examinado la actividad de DTG frente a un panel de virus con mutaciones dirigidas en el gen de la IN del VIH-2 subtipo A ([Smith et al., 2015](#)). Curiosamente, eran pocos los aminoácidos que no tenían un impacto en la susceptibilidad a DTG (T97A, G140S, Q148H o N155H), mientras que, por el contrario, los cambios G140S+Q148R, N155H+E92Q, N155H+T97A, Y143C+T97A y Q148K conducían a niveles de resistencia moderados y elevados a DTG ([Smith et al., 2015](#)). En base a estos resultados, todos los pacientes deberían haber exhibido resistencia cruzada a DTG.

De los cinco pacientes que se trataron con combinaciones basadas en DTG tras el FV a RAL (Y143G en 2 y N155H en 3 sujetos), a excepción del paciente 3, todos mostraron una reducción en la CV. Estudios previos describieron la eficacia a corto plazo de DTG en pacientes con VIH-2 que habían fracasado a RAL ([Treviño et al., 2015](#); [Descamps et al., 2015](#)). Posteriormente, tras una mediana de 14 meses, 3 respondedores iniciales hicieron FV. Los tres habían seleccionado el patrón N155H+I84V+A153S/G tras FV a RAL. En el momento del FV a DTG, este patrón desapareció. Dos seleccionaron Q148K/R y el tercero G118R. En los tres aparecieron otros cambios menores.

En clones moleculares, Fransen y colaboradores ([Fransen et al., 2012](#)), observaron que, en VIH-1, el cambio N155H es gradualmente reemplazado por Y143R o Q148H/R tras la continua exposición a RAL. El patrón G140S+Q148R parece ser el de mayor “fitness” viral, mientras que también otorga los niveles más altos de resistencia a RAL ([Quashie et al., 2013](#)). Curiosamente, este patrón ya ha sido asociado con una susceptibilidad reducida a DTG en la infección por VIH-1 ([Castagna et al., 2014](#)). Con estos datos, es posible que los cambios en el codón Q148 tengan un efecto similar en el VIH-2, considerando la evolución en los patrones de resistencia en el gen de la IN en los pacientes de este estudio. El cambio detectado en el paciente 6, G118R, fue más inesperado. Sin embargo, este cambio ya ha demostrado otorgar resistencia a DTG en SIVmac239 y en VIH-1 ([Hassounah et al., 2014](#); [Malet et al., 2014](#); [Munir et al., 2015](#); [Brenner et al., 2016](#)).

En conclusión, existe un amplio repertorio de mutaciones de resistencia en el gen de la IN de los pacientes infectados por VIH-2 que fracasan a RAL y/o a DTG. Aunque DTG es eficaz en la mayoría de los pacientes que albergan mutaciones de resistencia principales a RAL y a EVG, los datos que se han presentado en este trabajo muestran que la barrera genética al desarrollo de resistencias a DTG podría ser más baja en el VIH-2 comparando con la infección por VIH-1. Teniendo en cuenta las limitadas opciones terapéuticas para la supresión del ARN de VIH-2, estos resultados subrayan la importancia de priorizar combinaciones de fármacos antirretrovirales potentes en la infección por VIH-2, de forma que se maximice el beneficio a largo plazo del TARGA. Debe tenerse una especial atención en evitar la selección de mutaciones de resistencia a fármacos, que podrían, en última instancia, generar resistencia cruzada.

## CONCLUSIONES

---



1. El 9% de los pacientes infectados por VIH-2 en España están además infectados por VIH-1. El flujo continuo de inmigración de los países de África occidental parece explicar en gran medida la tasa de coinfección.
2. Las combinaciones de tratamiento antirretroviral que incluyen inhibidores de la integrasa o de la proteasa activos frente al VIH-2, pueden suprimir eficazmente la replicación de ambos virus. En la serie española, el 70% de los pacientes alcanzaron viremia indetectable para los dos virus.
3. Las combinaciones de antirretrovirales basadas en inhibidores de la integrasa constituyen una opción terapéutica eficaz y segura en pacientes con infección por VIH-2, suprimiendo la replicación del virus en el 89% de los pacientes “naive” y en más del 65% de los pacientes pretratados.
4. La proporción de pacientes infectados por VIH-2 que desarrollan mutaciones de resistencia tras fracasar a combinaciones de tratamiento que incluyen inhibidores de la integrasa parece ser mayor a la descrita en la infección por VIH-1. Esto sugiere que la barrera genética en el VIH-2 a los inhibidores de la integrasa es más baja.
5. Existe un amplio repertorio de mutaciones de resistencia en pacientes infectados por VIH-2 que fracasan a raltegravir y/o dolutegravir. Las mutaciones más frecuentemente observadas en el gen de la integrasa incluyen cambios en las posiciones 143, 148 y 155.
6. Los pacientes con fracaso a raltegravir rescatados con dolutegravir que experimentan un nuevo fracaso terapéutico presentaron una evolución en el patrón de resistencias desde cambios en la posición 155 a 148. Además, hemos identificado por primera vez en VIH-2 cambios en las posiciones 118 y 263, así como el patrón Q148H+G140S en un paciente “naive” a inhibidores de la integrasa con fracaso a dolutegravir.
7. Los perfiles de resistencia a los inhibidores de la integrasa en pacientes con infección por VIH-2 implican un elevado número de cambios, lo que indica una posible resistencia cruzada entre los fármacos de esta familia, incluso para los más recientes, como bictegravir y cabotegravir.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

**Bibliografia**

Aaby P, Poulsen G, Larsen O, et al. Does HIV-2 protect against HIV-1 infection? *AIDS* 1997;11:939-40.

Alexander T. Human immunodeficiency virus diagnostic testing: 30 years of evolution. *Clin Vaccine Immunol* 2016;23:249-53.

Andersson S, Norrgren H, da Silva, Z, et al. Plasma viral load in HIV-1 and HIV-2 singly and dually infected individuals in Guinea-Bissau, West Africa: significantly lower plasma virus set point in HIV-2 infection than in HIV-1 infection. *Arch Intern Med* 2000;160:3286-93.

Andrews C, Mohri H, Bernard L, et al. Evaluation of resistance to cabotegravir long-acting (CAB LA) in SIMmac251-infected macaques. *AIDS Res Hum Retrov* 2016;32:43.

Anstett K, Brenner B, Mesplede T, et al. HIV drug resistance against strand transfer integrase inhibitors. *Retrovirology* 2017;14:36.

Ba S, Raugi D, Smith R, et al. A trial of a single tablet regimen of elvitegravir, cobicistat, emtricitabine, and tenofovir disoproxil fumarate for the initial treatment of HIV-2 infection in a resource-limited setting: 48 week results from Senegal, West Africa. *Clin Infect Dis* 2018;67:1588-94.

Balestre E, Ekouevi D, Tchounga B, et al. Immunologic response in treatment-naïve HIV-2-infected patients: the leDEA West Africa cohort. *J Int AIDS Soc* 2016;19:20044.

Barin F, Cazein F, Lot F, et al. Prevalence of HIV-2 and HIV-1 group O infections among new HIV diagnoses in France: 2003-2006. *AIDS* 2007;21:2351-3.

Benítez-Gutiérrez L, Soriano V, Requena S, et al. Treatment and prevention of HIV infection with long-acting antiretrovirals. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2018;11(5):507-17.

Bercoff D, Triqueneaux P, Lambert C, et al. Polymorphisms of HIV-2 integrase and selection of resistance to raltegravir. *Retrovirology* 2010;7:98.

Borget M, Diallo K, Adje-Toure C, et al. Virologic and immunologic responses to antiretroviral therapies among HIV-1 and HIV-2 dually infected patients: case reports from Abidjan, Côte d'Ivoire. *J Clin Virol* 2008;45:72-5.

Brenner B, Thomas R, Blanco J, et al. Development of a G118R mutation in HIV-1 integrase following a switch to dolutegravir monotherapy leading to cross-resistance to integrase inhibitors. *J Antimicrob Chemother* 2016;71:1948-53.

Campbell-Yesufu O, Gandhi R. Update on human immunodeficiency virus (HIV)-2 infection. *Clin Infect Dis* 2011;52:780-7.

Carvalho A, Valadas E, França L, et al. (2012). Population mobility and the changing epidemics of HIV-2 in Portugal. *HIV Med* 2012;13:219-25.

Castagna A, Maggiolo F, Penco G, et al. Dolutegravir in antiretroviral-experienced patients with raltegravir- and/or elvitegravir-resistant HIV-1: 24-week results of the phase III VIKING-3 study. *J Infect Dis* 2014;210:354-62.

Cavaco-Silva J, Abecasis A, Miranda A, et al. HIV-2 integrase polymorphisms and longitudinal genotypic analysis of HIV-2 infected patients failing a raltegravir-containing regimen. *PLoS One* 2014;9:e92747.

Centers for Disease Control and Prevention and Association of Public Health Laboratories. Laboratory testing for the diagnosis of HIV infection: updated recommendation. 2014. Disponible en: <http://stacks.cdc.gov/view/cdc/23447> [Último acceso 20 febrero 2019].

Charpentier C, Camacho R, Ruelle J, et al. HIV-2EU supporting standardized HIV-2 drug-resistance interpretation in Europe: an update. *Clin Infect Dis* 2015;61:1346-7.

Charpentier C, Larrouy L, Collin G, et al. In-vitro phenotypic susceptibility of HIV-2 clinical isolates to the integrase inhibitor S/GSK1349572. *AIDS* 2010;24:2753-55.

Charpentier C, Roquebert B, Delelis O, et al. Hot spots of integrase genotypic changes leading to HIV-2 resistance to raltegravir. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:1293-5.

Cilla G, Rodés B, Pérez-Trallero E, et al. Molecular evidence of homosexual transmission of HIV type 2 in Spain. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001;17:417-22.

Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 1986;233:343-6.

De Clercq E, Li G. Approved antiviral drugs over the past 50 years. *Clin Microbiol Rev* 2016;29:695-747.

Desbois D, Roquebert B, Peytavin G, et al. In vitro phenotypic susceptibility of human immunodeficiency virus type 2 clinical isolates to protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:1545-8.

Descamps D, Peytavin G, Visseaux B, et al. Dolutegravir in HIV-2-infected patients with resistant virus to first-line integrase inhibitors from the French named patient program. *Clin Infect Dis* 2015;60:1521-7.

Dow D, Bartlett J. Dolutegravir, the second-generation of integrase strand transfer inhibitors (INSTIs) for the treatment of HIV. *Infect Dis Ther* 2014;3:83-102.

Ekouevi D, Balestre E, Coffie P, et al. Characteristics of HIV-2 and HIV-1/HIV-2 dually seropositive adults in West Africa presenting for care and antiretroviral therapy: the leDEA-West Africa HIV-2 cohort study. *PLoS One* 2013;8:e66135.

Ekouevi D, Tchounga B, Coffie P, et al. Antiretroviral therapy response among HIV-2 infected patients: a systematic review. *BMC Infect Dis* 2014;14:461.

Eron J, Clotet B, Durant J et al. Safety and efficacy of dolutegravir in treatment-experienced subjects with raltegravir-resistant HIV Type 1 infection: 24-week results of the VIKING study. *J Infect Dis* 2013;207:740-8.

Esbjörnsson J, Månsson F, Kvist A, et al. Increased survival among HIV-1 and HIV-2 dual-infected individuals compared to HIV-1 single-infected individuals: *AIDS* 2014;28:949-57.

Esbjörnsson J, Månsson F, Kvist A, et al. Inhibition of HIV-1 disease progression by contemporaneous HIV-2 infection. *N Engl J Med* 2012;367:224-32.

- Faria N, Hodges-Mameletzis I, Silva J, et al. Phylogeographical footprint of colonial history in the global dispersal of human immunodeficiency virus type 2 group A. *J Gen Virol* 2012;93:889-99.
- Ferns R, Garson J. Development and evaluation of a real-time RT-PCR assay for quantification of cell-free human immunodeficiency virus type 2 using a Brome mosaic virus internal control. *J Virol Methods* 2006;135:102-8.
- Fransen S, Gupta S, Frantzell A, et al. Substitutions at amino acid positions 143, 148, and 155 of HIV-1 integrase define distinct genetic barriers to raltegravir resistance in vivo. *J Virol* 2012;86:7249-55.
- Fulcher J, Du Y, Zhang T, et al. Emergence of integrase resistance mutations during initial therapy containing dolutegravir. *Clin Infect Dis* 2018;67:791-4.
- Gao F, Yue L, Robertson D, et al. Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. *J Virol* 1994;68:7433-47.
- Garrett N, Xu L, Smit E, et al. Raltegravir treatment response in an HIV-2 infected patient: a case report. *AIDS* 2008;22:1091-2.
- Ghys P, Diallo M, Ettiègne-Traore V, et al. Increase in condom use and decline in HIV and sexually transmitted diseases among female sex workers in Abidjan, Côte d'Ivoire, 1991-1998. *AIDS* 2002;16:251-8.
- Gilleece Y, Chadwick D, Breuer J, et al. British HIV Association guidelines for antiretroviral treatment of HIV-2-positive individuals 2010. *HIV Med* 2010;11:611-9.
- Gottlieb G. Treatment of HIV-2 infection. 2018. Disponible en: <https://www.uptodate.com/contents/treatment-of-hiv-2-infection> (último acceso septiembre 2018).
- Gottlieb G, Eholié S, Nkengasong J, et al. A call for randomized controlled trials of antiretroviral therapy for HIV-2 infection in West Africa. *AIDS* 2008;22:2069-72.
- Gottlieb G, Raugi D, Smith R. 90-90-90 for HIV-2? Ending the HIV-2 epidemic by enhancing care and clinical management of patients infected with HIV-2. *Lancet HIV* 2018;5:e390-9.
- Gottlieb G, Salif Sow P, Hawes S, et al. Molecular epidemiology of dual HIV-1/HIV-2 seropositive adults from Senegal, West Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003;19:575-84.
- Gottlieb G, Smith R, Dia Badiane N, et al. HIV-2 integrase variation in integrase inhibitor-naïve adults in Senegal, West Africa. *PLoS One* 2011;6:e22204.
- Gottlieb G, Sow P, Hawes S, et al. Equal plasma viral loads predict a similar rate of CD4+ T cell decline in human immunodeficiency virus (HIV) type 1- and HIV-2- infected individuals from Senegal, West Africa. *J Infect Dis* 2002;185:905-14.
- Grobler J, Hazuda D. Resistance to HIV integrase strand transfer inhibitors: in vitro findings and clinical consequences. *Curr Opin Virol* 2014;8:98-103.
- Hahn B, Shaw G, De Cock K, et al. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 2000;287:607-14.

- Harries K, Zachariah R, Manzi M, et al. Baseline characteristics, response to and outcome of antiretroviral therapy among patients with HIV-1, HIV-2 and dual infection in Burkina Faso. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2010;104:154-61.
- Hassounah S, Mesplede T, Quashie P, et al. Effect of HIV-1 integrase resistance mutations when introduced into SIVmac239 on susceptibility to integrase strand transfer inhibitors. *J Virol* 2014;88:9683-92.
- Hingrat Q, Collin G, Lê M, et al. A new mechanism of resistance of HIV-2 to integrase inhibitors: a 5 amino-acids insertion in the integrase C-terminal domain. *Clin Infect Dis* 2018 [Epub ahead of print].
- Hønge B, Jespersen S, Medina C, et al. The challenge of discriminating between HIV-1, HIV-2 and HIV-1/2 dual infections. *HIV Med* 2018;19:403-10.
- Ibe S, Yokomaku Y, Shiino T, et al. HIV-2 CRF01\_AB: First circulating recombinant form of HIV-2. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010;54:241-7.
- Jallow S, Alabi A, Sarge-Njie R, et al. Virological response to highly active antiretroviral therapy in patients infected with human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) and in patients dually infected with HIV-1 and HIV-2 in the Gambia and emergence of drug-resistant variants. *J Clin Microbiol* 2009;47:2200-8.
- Jones G, Yu F, Zeynalzadegan A, et al. Preclinical evaluation of GS-9160, a novel inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 integrase. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:1194-1203.
- Kobayashi M, Yoshinaga T, Seki T, et al. In vitro antiretroviral properties of S/GSK1349572, a next-generation HIV integrase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:813-21.
- Landman R, Damond F, Gerbe J, et al. Immunovirological and therapeutic follow up of HIV-1/HIV-2 dually seropositive patients. *AIDS* 2009;23:426-8.
- Lemey P, Pybus O, Wang B, et al. Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:6588-92.
- Lennox J, DeJesus E, Lazzarin A, et al. Safety and efficacy of raltegravir-based versus efavirenz-based combination therapy in treatment-naïve patients with HIV-1 infection: a multicentre, double-blind randomised controlled trial. *Lancet* 2009;374:796-806.
- Lindman J, Hønge B, Kjerulff B, et al. Performance of Bio-Rad HIV-1/2 Confirmatory Assay in HIV-1, HIV-2 and HIV-1/2 dually reactive patients - comparison with INNO-LIA and immunocomb discriminatory assays. *J Virol Methods* 2019;268:42-7.
- MacNeil A, Sarr A, Sankale J, et al. Direct evidence of lower viral replication rates in vivo in human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) infection than in HIV-1 infection. *J Virol* 2007;81:5325-30.
- Mahdi M, Szojka Z, Mótyán J, et al. Inhibitory effects of HIV-2 Vpx on replication of HIV-1. *J Virol* 2018;92:e00554.
- Malet I, Gimferrer Arriaga L, Artese A, et al. New raltegravir resistance pathways induce broad cross-resistance to all currently used integrase inhibitors. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:2118-22.

- Malet I, Subra F, Charpentier C, et al. Mutations located outside the integrase gene can confer resistance to HIV-1 integrase strand transfer inhibitors. *MBio* 2017;8:e00922.
- Margot N, Hluhanich R, Jones G et al. In vitro resistance selections using elvitegravir, raltegravir, and two metabolites of elvitegravir M1 and M4. *Antiviral Res* 2012;93:288-96.
- Matheron S, Damond F, Benard A, et al. CD4 cell recovery in treated HIV-2-infected adults is lower than expected: results from the French ANRS CO5 HIV-2 cohort. *AIDS* 2006;20:459-62.
- Matheron S, Descamps D, Gallien S, et al. First-line raltegravir/emtricitabine/tenofovir combination in human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) infection: A phase 2, noncomparative trial (ANRS 159 HIV-2). *Clin Infect Dis* 2018;67:1161-7.
- de Mendoza C, Cabezas T, Caballero E, et al. HIV type 2 epidemics in Spain: challenges and missing opportunities. *AIDS* 2017;31:1353-64.
- Menéndez-Arias L, Álvarez M. Antiretroviral therapy and drug resistance in human immunodeficiency virus type 2 infection. *Antiviral Res* 2014;102:70-86.
- Mesplède T, Leng J, Pham H, et al. The R263K dolutegravir resistance-associated substitution progressively decreases HIV-1 integration. *MBio* 2017;8:e00157.
- Mesplède T, Quashie P, Osman N, et al. Viral fitness cost prevents HIV-1 from evading dolutegravir drug pressure. *Retrovirology* 2013;10:22.
- Munir S, Thierry E, Malet I, et al. G118R and F121Y mutations identified in patients failing raltegravir treatment confer dolutegravir resistance. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:739-49.
- Ni X, Delelis O, Charpentier C, et al. G140S/Q148R and N155H mutations render HIV-2 integrase resistant to raltegravir whereas Y143C does not. *Retrovirology* 2011;8:68.
- Norrgrén H, Andersson S, Biague A, et al. Trends and interaction of HIV-1 and HIV-2 in Guinea-Bissau, west Africa: no protection of HIV-2 against HIV-1 infection. *AIDS* 1999;13:701-7.
- O'Brien T, George J, Epstein J, et al. Testing for antibodies to human immunodeficiency virus type 2 in the United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1992;41:1-9.
- Olesen J, Jespersen S, da Silva Z, et al. HIV-2 continues to decrease whereas HIV-1 is stabilizing in Guinea Bissau. *AIDS* 2018;32:1193-8.
- Otten R, Ellenberger D, Adams D, et al. Identification of a window period for susceptibility to dual infection with two distinct human immunodeficiency virus type 2 isolates in a *Macaca nemestrina* (Pig-tailed Macaque) model. *J Infect Dis* 1999;180:673-84.
- Owen S, Ellenberger D, Rayfield M, et al. Genetically divergent strains of human immunodeficiency virus type 2 use multiple coreceptors for viral entry. *J Virol* 1998;72:5425-32.
- Panel on antiretroviral guidelines for adults and adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services. Disponible en: <http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf> (último acceso 25 octubre 2018).

- Pena M, Chueca N, Hernández-Febles M, et al. Use of next generation sequencing to study a first line failure to a dolutegravir containing regimen. 16th European Meeting on HIV & Hepatitis: Treatment Strategies & Antiviral Drug Resistance. 2018; Roma, 30 mayo a 1 de junio. (Abstract 31).
- Pérez-Parra S, Chueca N, Álvarez M, et al. High prevalence and diversity of HIV-1 non-B genetic forms due to immigration in southern Spain: a phylogeographic approach. *PLoS One* 2017;12:e0186928.
- Poulsen A, Aaby P, Frederiksen K, et al. Prevalence of and mortality from human immunodeficiency virus type 2 in Bissau, West Africa. *Lancet* 1989;1:827-31.
- Poveda E, Rodés B, Toro C, et al. Are fusion inhibitors active against all HIV variants? *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004;20:347-8.
- Quashie P, Mesplede T, Han Y, et al. Characterization of the R263K mutation in HIV-1 integrase that confers low-level resistance to the second-generation integrase strand transfer inhibitor dolutegravir. *J Virol* 2012;86:2696-705.
- Quashie P, Mesplède T, Wainberg M. Evolution of HIV integrase resistance mutations. *Curr Opin Infect Dis* 2013;26:43-9.
- Raugi D, Gottlieb G, Sow P, et al. HIV-1 outcompetes HIV-2 in dually infected Senegalese individuals with low CD4+ cell counts. *AIDS* 2013a;27:2441-50.
- Raugi D, Smith R, Ba S, et al. Complex patterns of protease inhibitor resistance among antiretroviral treatment-experienced HIV-2 patients from Senegal: implications for second-line therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2013b;57:2751-60.
- Raugi D, Smith R, Gottlieb G, and for the University of Washington-Dakar HIV-2 Study Group. Four amino acid changes in HIV-2 protease confer class-wide sensitivity to protease inhibitors. *J Virol* 2015;90:1062-9.
- Rayfield M, De Cock K, Heyward W, et al. Mixed Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection in an individual: demonstration of both HIV type 1 and type 2 proviral sequences by using polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1988;158:1170-5.
- Requena S, Treviño A, Cabezas T, et al. Drug resistance mutations in HIV-2 patients failing raltegravir and influence on dolutegravir response. *J Antimicrob Chemother* 2017;72:2083-8.
- Rockstroh J, Lennox J, DeJesus E, et al. Long-term treatment with raltegravir or efavirenz combined with tenofovir/emtricitabine for treatment-naïve human immunodeficiency virus-1–infected patients: 156-week results from STARTMRK. *Clin Infect Dis* 2011;53:807-16.
- Rodés B, Toro C, Jiménez V, et al. Viral response to antiretroviral therapy in a patient coinfecting with HIV type 1 and type 2. *Clin Infect Dis* 2005;41:e19-21.
- Roquebert B, Blum L, Collin G, et al. Selection of the Q148R integrase inhibitor resistance mutation in a failing raltegravir containing regimen: *AIDS* 2008a;22:2045-6.
- Roquebert B, Damond F, Collin G, et al. HIV-2 integrase gene polymorphism and phenotypic susceptibility of HIV-2 clinical isolates to the integrase inhibitors raltegravir and elvitegravir in vitro. *J Antimicrob Chemother* 2008b;62:914-20.



- Saag M, Benson C, Gandhi R, et al. Antiretroviral drugs for treatment and prevention of HIV infection in adults: 2018 recommendations of the international antiviral society–USA panel. *JAMA* 2018;320:379-96.
- Salgado M, Toro C, Simón A, et al. Mutation N155H in HIV-2 integrase confers high phenotypic resistance to raltegravir and impairs replication capacity. *J Clin Virol* 2009;46:173-5.
- Santiago M, Range F, Keele B, et al. Simian immunodeficiency virus infection in free-ranging sooty mangabeys (*Cercocebus atys atys*) from the Taï forest, Côte d'Ivoire: implications for the origin of epidemic human Immunodeficiency virus type 2. *J Virol* 2005;79:12515-27.
- Saraiya N, Kanagala V, Corpuz M. HIV-2 in the United States: rare but not forgotten. *AIDS* 2018;32:1547-9.
- Sarfo F, Bibby D, Schwab U, et al. Inadvertent non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI)-based antiretroviral therapy in dual HIV-1/2 and HIV-2 seropositive West Africans: a retrospective study. *J Antimicrob Chemother* 2009;64:667-9.
- Sax P, DeJesus E, Mills A, et al. Co-formulated elvitegravir, cobicistat, emtricitabine, and tenofovir versus co-formulated efavirenz, emtricitabine, and tenofovir for initial treatment of HIV-1 infection: a randomised, double-blind, phase 3 trial, analysis of results after 48 weeks. *Lancet* 2012;379:2439-48.
- Semenova E, Marchand C, Pommier Y. HIV-1 integrase inhibitors: update and perspectives. *Adv Pharmacol* 2008;56:199-228.
- Shafer R. Rationale and uses of a public HIV drug-resistance database. *J Infect Dis* 2006;194:S51-8.
- Shimura K, Kodama E, Sakagami Y, et al. Broad antiretroviral activity and resistance profile of the novel human immunodeficiency virus integrase inhibitor elvitegravir (JTK-303/GS-9137). *J Virol* 2008;82:764-74.
- de Silva T, van Tienen C, Rowland-Jones S, et al. Dual infection with HIV-1 and HIV-2: double trouble or destructive interference? *HIV Ther* 2010;4:305-23.
- Smith R, Raugi D, Pan C, et al. Three main mutational pathways in HIV-2 lead to high-level raltegravir and elvitegravir resistance: implications for emerging HIV-2 treatment regimens. *PLoS One* 2012;7:e45372.
- Smith R, Raugi D, Pan C, et al. In vitro activity of dolutegravir against wild-type and integrase inhibitor-resistant HIV-2. *Retrovirology* 2015;12:10.
- Smith R, Wu V, Zavala C, et al. In vitro antiviral activity of cabotegravir against HIV-2. *Antimicrob Agents Chemother* 2018a;62:e01299.
- Smith S, Zhao X, Burke T, et al. Efficacies of cabotegravir and bictegravir against drug-resistant HIV-1 integrase mutants. *Retrovirology* 2018b;15:37.
- Soriano V, Gutiérrez M, Heredia A, et al. Serial dilutions on synthetic peptide-based assays can resolve dual seroreactivity to HIV-1 and HIV-2. *Vox Sang* 1996;71:67-8.

- Soriano V, Gutiérrez M, Tuset C, et al. Multicenter study on the prevalence and diagnosis of HIV-2 infection among high-risk individuals in Spain. *Med Clin* 1993;100:531-5.
- Soriano V, Tor J, Ribera A, et al. HIV-1, HIV-2 and HTLV-1 infection in high-risk groups in Spain. *AIDS* 1989;3:615-6.
- Sousa J, Temudo M, Hewlett B, et al. Male circumcision and the epidemic emergence of HIV-2 in West Africa. *PLoS One* 2016;11:e0166805.
- Stanford HIV Drug Resistance Database. Major HIV-1 Drug resistance Mutations. Updated Oct 24, 2018. <https://hivdb.stanford.edu>
- Storto A, Visseaux B, Bertine M, et al. Minority resistant variants are also present in HIV-2-infected antiretroviral-naïve patients. *J Antimicrob Chemother* 2018;73:1173-6.
- Thiébaud R, Matheron S, Taieb A, et al. Long-term nonprogressors and elite controllers in the ANRS CO5 HIV-2 cohort. *AIDS* 2011;25:865-7.
- Thierry E, Deprez E, Delelis O. Different pathways leading to integrase inhibitors resistance. *Front Microbiol* 2017;7:2165.
- Travers K, Mboup S, Marlink R, et al. Natural protection against HIV-1 infection provided by HIV-2. *Science* 1995;268:1612-5.
- Treviño A, Cabezas T, Lozano A, et al. Dolutegravir for the treatment of HIV-2 infection. *J Clin Virol* 2015;64:12-5.
- Treviño A, de Mendoza C, Caballero E, et al. Drug resistance mutations in patients infected with HIV-2 living in Spain. *J Antimicrob Chemotherapy* 2011;66:1484-88.
- Tsiang M, Jones G, Goldsmith J, et al. Antiviral activity of bictegravir (GS-9883), a novel potent HIV-1 integrase strand transfer inhibitor with an improved resistance profile. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60:7086-97
- Dietrich U. HIV-1 entry inhibitors. *AIDS Rev* 2001;3:89-97.
- van der Loeff M, Awasana A, Sarge-Njie R, et al. Sixteen years of HIV surveillance in a West African research clinic reveals divergent epidemic trends of HIV-1 and HIV-2. *Int J Epidemiol* 2006;35:1322-8.
- van der Loeff M, Jaffar S, Aveika A, et al. Mortality of HIV-1, HIV-2 and HIV-1/HIV-2 dually infected patients in a clinic-based cohort in The Gambia: *AIDS* 2002;16:1775-83.
- Vavro C, Ruel T, Wiznia A, et al. Emergence of resistance in HIV-1 Integrase (IN) following dolutegravir (DTG) treatment in 6 to 18 year old participants enrolled in the P1093 study. 22nd International AIDS Conference. 2018; Ámsterdam, 23-27 julio. (Abstract 3839).
- Vidya Vijayan K, Karthigeyan K, Tripathi S, et al. Pathophysiology of CD4+ T-cell depletion in HIV-1 and HIV-2 infections. *Front Immunol* 2017;8:580.
- Visseaux B, Charpentier C, Ozanne A, et al. Tropism distribution among antiretroviral-naïve HIV-2-infected patients. *AIDS* 2015;29:2209-12.

Visseaux B, Damond F, Matheron S, et al. HIV-2 molecular epidemiology. *Infect Genet Evol* 2016;46:233-40.

Wang R, Horton J, Hopking J, et al. Resistance through week 48 in the DAWNING study comparing dolutegravir (DTG) plus 2 nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) compared with lopinavir/ritonavir (LPV/r) plus 2 NRTIs in second-line treatment. 22nd International AIDS Conference. 2018; Ámsterdam, 23-27 julio. (Abstract THPEB071).

Wensing A, Calvez V, Günthard H, et al. 2015 Update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Top Antivir Med* 2015;23:132-41.

Witvrouw M, Pannecouque C, Switzer W, et al. Susceptibility of HIV-2, SIV and SHIV to various anti-HIV-1 compounds: implications for treatment and postexposure prophylaxis. *Antivir Ther* 2004;9:57-65.

Xu L, Anderson J, Ferns B, et al. Genetic diversity of integrase (IN) sequences in antiretroviral treatment-naïve and treatment-experienced HIV type 2 patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2008;24:1003-7.

Xu L, Anderson J, Garrett N, et al. Dynamics of raltegravir resistance profile in an HIV type 2-infected patient. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009;25:843-7.

Yamaguchi J, Vallari A, Ndembu N, et al. HIV type 2 intergroup recombinant identified in Cameroon. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2008;24:86-91.

Zheng Y, Lambert C, Arendt V, et al. Virological and immunological outcomes of elvitegravir-based regimen in a treatment-naïve HIV-2-infected patient. *AIDS* 2014;28:2329-31.

## **ANEXOS**

---

## Anexo I. Índice de tablas y figuras

<b>TABLAS</b> .....	
<b>Tabla 1.</b> Interpretación de resistencias a los INI de la Red Española de Investigación en SIDA (RIS).....	24
<b>Tabla 2.</b> Hospitales y centros españoles miembros del grupo español de estudio de la infección por VIH-2.....	34
<b>Tabla 3.</b> Secuencias de los cebadores y sonda empleados en esta tesis.....	40
<b>Tabla 4.</b> Principales características epidemiológicas de los individuos coinfectados VIH-1+ VIH-2.....	50
<b>Tabla 5.</b> Principales características demográficas de la población infectada por VIH-2 tratada con INI.....	53
<b>Tabla 6.</b> Principales características clínicas de los pacientes VIH-2+ tratados con INI.....	55
<b>Tabla 7.</b> Características principales de los pacientes infectados por VIH-2 que fracasaron al tratamiento basado en INI.....	57
<b>Tabla 8.</b> Principales características de la población de estudio.....	60
<b>Tabla 9.</b> Características principales de los pacientes con fracaso a RAL.....	61
<b>Tabla 10.</b> Patrones de resistencia en la región de la IN en pacientes infectados por VIH-2 que fracasan a RAL.....	62
<b>Tabla 11.</b> Evolución de la secuencia del gen de la IN en los tres pacientes infectados por VIH-2 que fracasaron a DTG tras un fracaso previo a RAL.....	63
<b>FIGURAS</b> .....	
<b>Figura 1.</b> Estructura de un virión de VIH-2.....	7
<b>Figura 2.</b> Esquema del genoma de VIH-2 en dirección 5'-3'.....	8
<b>Figura 3.</b> Mapa mundial que representa los países donde se ha documentado la presencia de personas portadoras del VIH-2.....	10
<b>Figura 4.</b> Algoritmo para el diagnóstico de infección por VIH basado en la propuesta por el CDC. Imagen modificada y traducida a partir del algoritmo original para su mejor comprensión e inclusión del diagnóstico de VIH-2.....	13
<b>Figura 5.</b> Ciclo de replicación del VIH-1 y dianas de los fármacos antirretrovirales.....	15
<b>Figura 6.</b> Esquema de los dominios y motivos funcionales presentes en el gen de la IN del VIH.....	20

<b>Figura 7.</b> Actividades de la IN del VIH. Actividad de procesamiento 3' de los LTR del ADNc viral y transferencia de cadena de ADNc al ADN de la célula huésped.....	21
<b>Figura 8.</b> Estructura molecular de los INI aprobados (RAL, EVG, DTG, BIC) y CAB.....	22
<b>Figura 9.</b> Provincias a las que pertenecen los centros hospitalarios y/o diagnósticos integrantes del grupo español de estudio de la infección por VIH-2.....	34
<b>Figura 10.</b> Curvas de amplificación de las diluciones del estándar y curva de calibración resultante.....	38
<b>Figura 11.</b> Diseño de amplificación del gen de la IN del VIH-2.....	41
<b>Figura 12.</b> Reactividad e interpretación de los resultados observados en el ensayo de confirmación Pepti-LAV.....	48
<b>Figura 13.</b> Reactividad e interpretación de los resultados observados en el ensayo de confirmación INNO-LIA.....	48
<b>Figura 14.</b> Respuesta virológica al TARGA de 20 pacientes coinfectados por VIH-1 y VIH-2.....	52
<b>Figura 15.</b> Selección concomitante de variantes asociadas a las vías de resistencia Y143 y N155 en el paciente N1.....	58
<b>Figura 16.</b> Evolución de los pacientes que fueron rescatados con un TARGA basado en DTG tras fracaso previo a RAL.....	64

## **Anexo II. Miembros del grupo español de estudio de la infección por VIH-2.**

C. Rodríguez, M. Vera & J. del Romero (Centro Sanitario Sandoval, Madrid); M.D. Ocete (Hospital General Universitario, Valencia); E. Caballero (Hospital Vall d'Hebró, Barcelona); A. Aguilera (Hospital Conxo-CHUS, Santiago); M.J. Amengual & M. Cervantes (Corporación Sanitaria Parc Taulí, Barcelona); R. Benito & S. Algarate (Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza); R. Ortiz de Lejarazu & S. Rojo (Hospital Clínico Universitario, Valladolid); J.M. Eirós & C. Ramos (Hospital Río Hortega, Valladolid); J. García-Costa (Hospital Cristal-Piñor, Orense); E. Calderón (Hospital Virgen del Rocío, Sevilla; CIBER de Epidemiología y Salud Pública); M.J. Ríos-Villegas (Hospital Virgen Macarena, Sevilla). M. Trigo, J. Diz & M. García-Campello (Complejo Hospitalario, Pontevedra); M. Rodríguez-Iglesias (Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz); A. Hernández-Betancor (Hospital Insular Universitario, Las Palmas de Gran Canaria); J.M. Ramos & A. Gimeno (Hospital Universitario, Alicante); V. Sánchez (Hospital General, Elche); C. Gómez-Hernando (Complejo Hospitalario Virgen de la Salud, Toledo); G. Cilla & E. Pérez-Trallero (Hospital Donostia, San Sebastián); L. Fernández-Pereira (Hospital San Pedro de Alcántara, Cáceres); J. Niubó (Ciudad Sanitaria de Bellvitge, Barcelona); N. Margall (Hospital Santa Creu i

Sant Pau, Barcelona); M. Hernández, A.M. López-Lirola & J.L. Gómez-Sirvent (Hospital Universitario La Laguna, Tenerife); L. Force & M. Sauca (Hospital General, Mataró); S. Pérez & L. Morano (Hospital do Meixoeiro, Vigo); C. Raya (Hospital del Bierzo, Ponferrada); A. González Praetorius (Hospital Universitario, Guadalajara); C. Cifuentes, M. Peñaranda & María Dolores Macià (Hospital Son Espases, Palma Mallorca); M.C. Nieto (Hospital de Basurto, Bilbao); J.M. Montejo (Hospital de Cruces, Bilbao); L. Roc & A. Martínez-Sapiña (Hospital Miguel Servet, Zaragoza); I. Viciano (Hospital Virgen de la Victoria, Málaga); A.B. Lozano, E. Fernández-Fuertes & J.M. Fernández (Hospital de Poniente, Almería); T. Cabezas (Complejo Hospitalario Torrecárdenas, Almería); I. García Bermejo & G. Gaspar (Hospital Universitario de Getafe, Madrid); M. Górgolas, C. Vegas, J. Blas & R. Téllez (Fundación Jiménez Díaz, Madrid); L. Pérez, M. Valeiro & T. Aldamiz (Hospital Gregorio Marañón, Madrid); F. García (Hospital Clínico Universitario, Granada); A. Suárez & I. Rodríguez-Avial (Hospital Clínico San Carlos, Madrid); P. Barreiro (Hospital Universitario La Paz, Madrid); V. Soriano, F. Gómez-Gallego & O. Corral (UNIR Health Sciences School, Madrid); S. Requena, L. Benítez-Gutiérrez, V. Cuervas-Mons & C. de Mendoza (IIS Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda).

### Anexo III.

#### 1. Publicaciones surgidas de esta tesis

**Requena S**, Lozano AB, Caballero E, García F, Nieto MC, Téllez R, Fernández JM, Trigo M, Rodríguez-Avial I, Martín-Carbonero L, Miralles P, Soriano V, de Mendoza C, on behalf of the HIV-2 Spanish Study Group. **Clinical experience with integrase inhibitors in HIV-2-infected individuals in Spain.** J Antimicrob Chemother 2019; [Epub ahead of print].

**Requena S**, Treviño A, Cabezas T, García-Delgado R, Amengual MJ, Lozano AB, Peñaranda M, Fernández JM, Soriano V, de Mendoza C, on behalf of the Spanish HIV-2 Study Group. **Drug resistance mutations in HIV-2 patients failing raltegravir and influence on dolutegravir response.** J Antimicrob Chemother 2017;72:2083-8.

Un tercer artículo está siendo revisado por la revista AIDS para su publicación. Los autores y el nombre del artículo son:

**Requena S**, Caballero E, Lozano AB, Ríos-Villegas MJ, Benito R, Rojo S, Cabezas T, Macià MD, Nieto MC, Soriano V, de Mendoza C, on behalf of the HIV-2 Spanish Study Group. **Treatment outcome in dually HIV-1 and HIV-2 coinfecting patients living in Spain.**

## 2. Comunicaciones a congresos

L. Martín, **S. Requena**, S. García, A. Treviño, J.I. Bernardino, C. de Mendoza. **Selección de la mutación G118R tras fracaso a un tratamiento de rescate con dolutegravir en un paciente infectado por VIH-2**. X Congreso Nacional de GeSIDA. 2018; Madrid, de 6 a 9 de noviembre. (Código de presentación: P-190).

**S. Requena**; E. Caballero; AB Lozano; R. Téllez; L. Morano; MC Nieto; N. Margall; V. Soriano; C. de Mendoza. **HIV-2 molecular epidemiology in Spain: 30 years from the first case**. 23rd International Bioinformatic Workshop on Virus Evolution and Molecular Epidemiology (VEME). 2018; Berlín, 26-31 de agosto. (Abstract 19).

**S. Requena**; AB Lozano; MJ Ríos-Villegas; E. Caballero; S. Rojo; R. Benito; MT Cabezas; I. Carrasco; M. Cuesta; V. Soriano; C. de Mendoza. **Elevada tasa de coinfección VIH-1+VIH-2 en pacientes africanos residentes en España**. XXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2018; Bilbao, 24-26 de mayo. (Código de presentación: 0196).

**S. Requena**; E. Caballero; AB Lozano; R. Téllez; L. Morano; MC Nieto; N. Margall; V. Soriano; C. de Mendoza. **High Rate of HIV-1 Coinfection in HIV-2 West African Immigrants Living in Spain**. Poster awarded as the best presented. International Symposium on HIV and Emerging Infectious Diseases (ISHEID). 2018; Marsella, 16-18 de mayo. (Abstract DP-9).

**S. Requena**; A. Treviño; I. Carrasco; M. Cuesta; T. Cabezas; M. Dolores Suárez; A. Sáez; G. Cilla; P. Miralles; I. García-Arata; R. Téllez; L. Fernández Pereira; R. Rabuñal-Rey; V. Soriano; C. de Mendoza. **Características epidemiológicas de la infección por VIH-2 en España**. IX Congreso Nacional GeSIDA. 2017; Vigo, de 28 de noviembre a 1 de diciembre. (Código de presentación P-088).

**S. Requena**; A. Treviño; T. Cabezas; MD Suárez; A. Saez; G. Cilla; P. Miralles; I. Garcia-Arata; R. Tellez; L. Fernández; R. Rabuñal-Rey; V. Soriano; C. de Mendoza; Grupo Nacional para el Estudio del VIH-2. **Características epidemiológicas de la infección por VIH-2 en España**. Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2017; Málaga, 11-13 de mayo. (Código de presentación: 249).

**S. Requena**; C. de Mendoza; T. Cabezas; R. García; MJ Amengual; AB Lozano; JM Fernandez; V. Soriano; A. Treviño. **Drug Resistance Mutations in HIV-2 Patients Failing Raltegravir and Dolutegravir**. CROI Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. 2016; Boston, 22-25 de febrero. (Abstract 508).



### 3. Otras publicaciones durante el periodo de tesis doctoral

de Mendoza C, Pirón M, González R, Jiménez A, Caballero E, Roc L, Benito R, Ramos JM, Soriano V, **HTLV Spanish study group**. **Clinical presentation of individuals with Human T-Cell Leukemia Virus type-1 infection in Spain**. Open Forum Infect Dis 2019;6:ofz036.

Lledó G, Benítez-Gutiérrez L, Arias A, **Requena S**, Cuervas-Mons V, de Mendoza C. **Benefits of hepatitis C cure with antivirals: why test and treat?** Future Microbiol 2019;14:425-35.

Lledó GM, Carrasco I, Benítez-Gutiérrez LM, Arias A, Royuela A, **Requena S**, Cuervas-Mons V, de Mendoza C. **Regression of liver fibrosis after curing chronic hepatitis C with oral antivirals in patients with and without HIV coinfection**. AIDS 2018;32:2347-2352.

Benítez-Gutiérrez L, Soriano V, **Requena S**, Arias A, Barreiro P, de Mendoza C. **Treatment and prevention of HIV infection with long-acting antiretrovirals**. Expert Rev Clin Pharmacol 2018;11:507-17.

Carrasco I, Arias A, Benítez-Gutiérrez L, Lledó G, **Requena S**, Cuesta M, Cuervas-Mons V, de Mendoza C. **Baseline NS5A resistance associated substitutions may impair DAA response in real-world hepatitis C patients**. J Med Virol 2018;90:532-536.

de Mendoza C, Caballero E, Aguilera A, **Requena S**, Ortiz de Lejarazu R, Pirón M, González R, Jiménez A, Roc L, Treviño A, Benito R, Fernández-Alonso M, Aguinaga A, Rodríguez C, García-Costa J, Blanco L, Ramos JM, Calderón E, Eirós JM, Saulea S, Barreiro P, Soriano V, on behalf of the Spanish HTLV Network. **Human T-lymphotropic virus type 1 infection and disease in Spain**. AIDS. 2017;31:1653-63.

de Mendoza C, Cabezas T, Caballero E, **Requena S**, Amengual MJ, Peñaranda M, Sáez A, Téllez R, Lozano AB, Treviño A, Ramos JM, Pérez JL, Barreiro P, Soriano V, on behalf of the Spanish HIV-2 Network. **HIV type 2 epidemic in Spain: challenges and missing opportunities**. AIDS. 2017;31:1353-64

Treviño A, Aguilera A, Rodríguez-Iglesias M, Hernández A, Benito R, Roc L, Ramos JM, Ortiz de Lejarazu R, Rodríguez C, del Romero J, Calderón E, García-Costa J, **Requena S**, Soriano V, de Mendoza C, on behalf of the Spanish HTLV Network. **HTLV infection in HCV-antibody positive patients in Spain**. AIDS Res Hum Retroviruses. 2017;33:1013-101

Esposito I, Benítez-Gutiérrez L, Treviño A, Arias A, Citores MJ, **Requena S**, Soriano V, Cuervas-Mons V, de Mendoza C. **Impact of ITPA gene polymorphisms on the risk of ribavirin-induced**

**haemolytic anaemia using interferon-free antivirals for chronic hepatitis C.** Antivir Ther 2017;22:571-5.

Benítez-Gutiérrez L, de Mendoza C, Baños I, Duca A, Arias A, Treviño A, Requena S, Citores MJ, Cuervas-Mons V. **Drug-induced lung injury in a liver transplant patient treated with sofosbuvir.** Transplant Proc 2016;48:2515-8.

Treviño A, Caballero E, de Mendoza C, Aguilera A, Pirón M, Soriano V; Spanish HIV-2/HTLV Study Group. **The burden of neglected HIV-2 and HTLV-1 infections in Spain.** AIDS Rev. 2015;17:212-9.

#### **Anexo IV: Copia de las publicaciones surgidas de esta tesis**

Requena S, Lozano AB, Caballero E, García F, Nieto MC, Téllez R, Fernández JM, Trigo M, Rodríguez-Avial I, Martín-Carbonero L, Miralles P, Soriano V, de Mendoza C, on behalf of the HIV-2 Spanish Study Group. **Clinical experience with integrase inhibitors in HIV-2-infected individuals in Spain.** J Antimicrob Chemother 2019; [Epub ahead of print].

Requena S, Treviño A, Cabezas T, García-Delgado R, Amengual MJ, Lozano AB, Peñaranda M, Fernández JM, Soriano V, de Mendoza C, on behalf of the Spanish HIV-2 Study Group. **Drug resistance mutations in HIV-2 patients failing raltegravir and influence on dolutegravir response.** J Antimicrob Chemother 2017;72:2083-8.